

**UNIVERSITE MONTPELLIER II - SCIENCES ET TECHNIQUES DU
LANGUEDOC**

Ecole doctorale SIBAGHE
Biologie Intégrative des Plantes

Thèse
pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université Montpellier 2

**Identification de gènes impliqués
dans la tolérance au Plomb chez la brassicacée,
*Hirschfeldia incana***

Présentée et soutenue publiquement le 14 Décembre 2012

Par
Florence AUGUY

Directeur de thèse : Patrick Dumas

JURY

Sébastien Thomine
Alain Vavasseur
Michel Lebrun
Patrick Dumas

DR CNRS
DR CEA
Pr Université Montpellier 2
CR/HDR INRA

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de thèse

Thèse préparée au sein du Laboratoire de Biotechnologies des Plantes (LBP), Centre National de l'Energie, des Sciences et des Techniques Nucléaires (CNESTEN), Rabat, Maroc, dans le cadre du Laboratoire Mixte International « Biotechnologie microbienne et végétale » (IRD-UMR DIADE/CNESTEN/Université Mohammed V).

**UNIVERSITE MONTPELLIER II - SCIENCES ET TECHNIQUES DU
LANGUEDOC**

Ecole doctorale SIBAGHE
Biologie Intégrative des Plantes

Thèse
pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université Montpellier 2

**Identification de gènes impliqués
dans la tolérance au Plomb chez la brassicacée,
*Hirschfeldia incana***

Présentée et soutenue publiquement le 14 Décembre 2012

Par
Florence AUGUY

Directeur de thèse : Patrick Dumas

JURY

Sébastien Thomine
Alain Vavasseur
Michel Lebrun
Patrick Dumas

DR CNRS
DR CEA
Pr Université Montpellier 2
CR/HDR INRA

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de thèse

Thèse préparée au sein du Laboratoire de Biotechnologies des Plantes (LBP), Centre National de l'Energie, des Sciences et des Techniques Nucléaires (CNESTEN), Rabat, Maroc, dans le cadre du Laboratoire Mixte International « Biotechnologie microbienne et végétale » (IRD-UMR DIADE/CNESTEN/Université Mohammed V).

Identification de gènes impliqués dans la tolérance au Plomb chez la brassicacée, *Hirschfeldia incana*

Résumé

L'exploitation, puis l'abandon des sites miniers dans l'est marocain, a entraîné une importante pollution des zones avoisinantes, générée par la dispersion de déchets riches en Pb. Pour résoudre ce problème, des programmes de phytomanagement sont à développer. Cependant, la réalisation de ces projets se heurte à deux contraintes : une faible diversité des plantes métallobytophytes et une méconnaissance des mécanismes de la tolérance au Pb.

Dans ce contexte, l'objectif de mon travail de thèse a été de sélectionner une ou des plantes susceptibles d'entrer dans un programme de phytoremédiation et d'identifier des gènes impliqués dans la tolérance au Pb.

Dans un premier temps, l'analyse des sols et des résidus miniers a révélé une importante contamination polymétallique du site d'étude. Des prospections floristiques ont ensuite permis d'identifier une plante de la famille des brassicacées, *Hirschfeldia incana*, prédominante sur les sites miniers pollués et qui accumule le Pb. L'accumulation du Pb chez *H. incana* a été confirmée en conditions contrôlées et une stratégie « gène candidat » a montré l'implication dans la tolérance au Pb de deux gènes, l'un codant pour une métallothionéine MT2a et l'autre pour un transporteur membranaire HMA4. Enfin, la comparaison des transcriptomes d'*H. incana* et d'*A. thaliana* a abouti à l'édification d'une liste de gènes candidats susceptibles d'être impliqués dans la tolérance au Pb. L'analyse fonctionnelle de quatre de ces gènes, codant pour une ferritine, une métallothionéine, une protéine fixatrice du cuivre et une défensine, a précisé leur rôle dans la tolérance au Pb.

Mots clés : *Hirschfeldia incana*, plomb (Pb), tolérance, déchets miniers, pollution, phytoremédiation, *Arabidopsis thaliana*, transcriptome, Maroc.

Identification of genes involved in lead tolerance in *Hirschfeldia incana* (brassicaceae)

Abstract

Exploited, and then abandoned, mining sites, in the eastern Morocco, have polluted the neighboring regions, by dispersion of mining wastes containing Pb. Facing this problem, it is necessary to develop phytomanagement programs. Nevertheless, these project realisations encountered two major constraints: weak metallobytophyte plant diversity and misunderstanding of Pb tolerance mechanisms.

In this context, the objectif of my work was to select plants compatible with a phytoremediation program and to identify genes implicated in lead tolerance.

Firstly, soil and mining waste analysis has revealed an important polymetallic pollution of the studied region. Then, floristic explorations had permitted to identify a plant of the brassicaceae family, *Hirschfeldia incana*, which is predominant on the polluted mining regions and accumulated Pb. Pb accumulation in *H. incana* was confirmed in controlled conditions and a candidate gene approach has shown the lead tolerance implication of two genes, one coding for a metallothionein (MT2a) and the other a membrane transporter (HMA4). Finally, the transcriptome comparison from *H. incana* and *A. thaliana* has generated a list of candidate genes putatively implicated in Pb tolerance. Functional analysis of four genes, coding a ferretin, a metallothionein, a copper binding protein and a defensin, has permitted to clarify their role in Pb tolerance.

Key words: *Hirschfeldia incana*, lead (Pb), tolerance, mining wastes, pollution, phytoremediation, *Arabidopsis thaliana*, transcriptome, Morocco.

Thèse préparée au sein du Laboratoire de Biotechnologies des Plantes (LBP), Centre National de l'Energie, des Sciences et des Techniques Nucléaires (CNESTEN), Rabat, Maroc, dans le cadre du Laboratoire Mixte International « Biotechnologie microbienne et végétale » (IRD-UMR DIADE/CNESTEN/Université Mohammed V).

Remerciements

Tous mes remerciements et ma gratitude à Mohammed Mzibri et à Aziz Smouni qui m'ont accueillie pendant ces trois années dans leur Unité et leur équipe du CNESTEN de Rabat, ainsi qu'au professeur Karim Filali-Maltouf pour son soutien indéfectible et sa confiance en tant que Directeur du LMI « Biotechnologie microbienne et végétale ».

Un grand merci à Patrick Dumas, mon Directeur de thèse, qui a assumé son rôle contre vents et marées et avec qui j'ai partagé les quelques « galères » inhérentes à cette première expatriation mais surtout, les bons moments que nous a réservée cette expérience.

Merci à Serge Hamon, mon Directeur d'Unité, pour m'avoir permis de mener à bien ce projet dans de bonnes conditions, ainsi qu'à Pierre Berthomieu qui m'a accueillie dans son équipe pour finaliser ce manuscrit.

Mes plus vifs remerciements à Bernard Dreyfus et Robert Arfi, pour le soutien qu'ils ont manifesté à ce programme.

Je garderais un très bon souvenir de ces trois années passées au Maroc, en partie, grâce à la bonne ambiance qui régnait au CNESTEN, donc merci à tous, pour votre accueil sympathique. Merci aussi, à tous les collègues français et marocains de l'université Mohammed V et de l'UATRS avec qui j'ai pris beaucoup de plaisir à travailler.

Un remerciement tout particulier à Patricia Moulin, pour l'aide qu'elle m'a apportée en particulier dans les analyses ICP et pour tous ses précieux conseils sur la vie en expatriation.

Merci à Gilles Béna pour sa disponibilité (même si c'était souvent par skype) et son soutien lorsque j'ai eu des petits coups de mou.

Mes remerciements vont aussi à mes Professeurs de Biologie qui m'ont donné envie de travailler dans ce domaine de M^{elle} Assézat au collège de Saint Geniez d'Olt, en passant par M^{me} Revel ma prof de terminale au lycée à Rodez puis pour finir M^{me} Maurel professeur de biologie cellulaire en BTS Biotechnologies à Decazeville.

Je remercie aussi les équipes qui ont jalonné mon parcours avant mon entrée à l'IRD et qui ont participé à ce que je suis aujourd'hui professionnellement : le laboratoire de Biotechnologies de la « RAGT » à Rodez, le laboratoire de contrôle qualité de « Clonatec » à Paris et le laboratoire de Génétique du CIRAD-Forêt à Nogent/Marne.

Et bien sûr, mes remerciements aux membres de l'équipe « Rhizo », avec qui j'ai évolué pendant de nombreuses années et dont je ne retiendrais que les bons moments passés en leur compagnie.

Et enfin, un remerciement tout particulier à Philippe, Vinciane et Jean-Baptiste qui m'ont suivie dans cette « aventure » et qui m'ont supportée, dans tous les sens du terme, pendant ces trois années.

A Michèle

Table des matières

Table des matières	1
Liste des abréviations	5
Liste des figures	7
Liste des tableaux	9
Chapitre 1 : Introduction	11
1) Le plomb : définition	13
2) Le plomb dans l'environnement	13
1-1) Origine naturelle	13
1-2) Origine anthropique	13
3) Le plomb et la santé humaine	17
4) Les principaux effets du plomb sur les plantes	19
4-1) Equilibre hydrique de la cellule	20
4-2) Nutrition minérale	20
4-3) Photosynthèse	20
4-4) Respiration	21
4-5) Génotoxicité	21
4-6) Stress oxydatif	21
5) Méthodes de dépollution des sols	22
5-1) Méthodes physico-chimiques	22
5-2) Bioremédiation	24
6) Mécanismes moléculaires de la tolérance au plomb	30
6-1) Transport	33
6-2) Chélation	36
6-3) Séquestration ou compartimentation	40
7) Objectifs de la thèse	40
7-1) Identifier et caractériser une plante endémique au Maroc, tolérante au Pb	41
7-2) Identifier des gènes impliqués dans la tolérance du Pb	42
Chapitre 2 : Description du site d'étude	43
1) Contexte marocain	45
2) Présentation du site d'étude et analyse des sols	47
3) Inventaire floristique et teneurs en ETMs des plantes endémiques	54
3-1) Sites de prélèvements	54

3-2) Inventaire floristique	56
3-3) Teneurs en ETM des plantes	57
3-4) Choix du modèle d'étude	58
Chapitre 3 : La tolérance et l'accumulation du Pb chez <i>Hirschfeldia incana</i>, une brassicacée méditerranéenne	63
Résumé	67
Introduction	68
Matériel et Méthodes	70
Résultats	76
Discussion	81
Références	87
Figures et tableau	93
Informations supplémentaires	99
Chapitre 4 : Identification de gènes impliqués dans la tolérance au Pb	103
1) Introduction	105
2) Résultats	106
2-1) Choix de la concentration en Pb, du temps d'application et caractérisation physiologique du matériel végétal	108
2-2) Analyse transcriptomique	109
2-3) Analyse fonctionnelle	127
3) Discussion	133
3-1) La méthodologie adoptée a-t-elle permis d'identifier des gènes impliqués dans la tolérance au Pb?	135
3-2) La liste des gènes candidats contient-elle des gènes impliqués dans la tolérance au Pb ?	136
3-3) Les gènes caractérisés sont-ils impliqués dans les mécanismes de tolérance au Pb ?	143
Chapitre 5 : Conclusions et Perspectives	147
Chapitre 6 : Matériel et Méthodes	155
1) Matériel	157
1-1) Matériel végétal	157
1-2) Echantillons de sol	157
1-3) Bactéries	157

1-4) Plasmides	157
1-5) Amorces	158
2) Méthodes	158
2-1) Milieux de culture	158
2-2 Transformation génétiques	159
2-3) Biologie moléculaire	160
2-4) Mesure de longueur de la racine primaire	168
2-5) Dosage du Pb	168
2-6) Analyse statistique	169
2-7) Analyse bio-informatique	169
Références bibliographiques	171

Liste des abréviations

ABA : Abscissic acid
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
ADNr : ADN ribosomique
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
ATM : ABC transporter mitochondrial
ATP : Adénosine tri-phosphate
ATPase : Adénosine tri-phosphatase
CBP : Calmodulin-binding protein
CDF : Cation Diffusion Facilitator
CNGC : Cyclic nucleotide-gated ion channel
Col-0 : Ecotype Columbia
CSH : Cross Species Hybridisation
Ct : Cycle threshold
CUBD : protéine de liaison au cuivre
CYP : cytochrome P450
EDTA : Ethylène diamine tétra-acétique
ET : Ecart type
ETM : Elément trace métallique
FBC : Facteur de bioconcentration
FC : Fold change
FRD : Ferric Reductase Defective
 γ -EC : γ -glutamylcystéine
GMPc : Guanine monophosphate cyclique
Glu : Glutamine
Gly : Glycine
GO : Gene ontology
GPS : Global positioning system
GSH : Glutathion
GST : glutathion-S-transférase
HMA : Heavy metal ATPase

HSP : Heat Shock Protein
 IAA : Indole-3 acetic acid
 ICP-AES : Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry
 IRT : Iron regulated transporter
 ITS : Internal transcribed spacer
 LCT : Low Affinity Cation Transporter
 MATE : Multidrug and toxin efflux family
 MHX : Mg^{2+}/H^{+} exchanger
 MS : Masse Sèche
 MT : Méthionine
 MTP : Mouse transporter protein
 NA : Nicotianamine
 NAC : No apical meristem (NAM), Arabidopsis transcription activation factor (ATAF), Cup-shaped cotyledon (CUC)
 NAS : Nicotianamine synthétase
 NASC : Nottingham Arabidopsis Stock Centre
 NRAMP : Natural Resistance-Associated Macrophage Protein
 ORF : Phase ouverte de lecture
 PA : Parties aériennes
 PC : Phytochélatine
 PCR : Polymerase chain reaction
 PDF : Plant defensin
 PDR : Pleiotropic drug resistance
 PR : Pathogenesis related protein
 QPCR : PCR quantitative
 RACE-PCR : Rapid Amplification of cDNA Ends with PCR
 RIN : RNA integrity number
 ROS : Espèce réactive à l'oxygène
 SDS : Sodium dodécyl-sulfate
 SOD : Superoxyde dismutase
 TDT : Tonoplast Dicarboxylate Transporter
 TF : Facteur de translocation
 ZAT : Zn transporter of Arabidopsis thaliana
 ZIP : Zinc and Iron regulated transporters Protein

Liste des figures

Figure 1 : Production de Pb dans le monde au cours des 5000 dernières années.	14
Figure 2 : Répartition et évolution de l'émission de Pb dans l'atmosphère en France en t.15	
Figure 3 : Digue de déchets miniers provenant de l'extraction du Pb à proximité du village de Touissit, Maroc.	17
Figure 4 : Voies de contamination de l'homme par le Pb.	18
Figure 5 : Effets du Pb sur la santé humaine en fonction de la concentration en Pb en µg/L de sang.	18
Figure 6 : Classement des techniques de dépollution des sols en fonction du lieu de traitement.	22
Figure 7 : Devenir des polluants inorganiques en fonction de la méthode de phytoremédiation utilisée.	26
Figure 8 : Représentation schématique des principales adaptations mises en place chez les plantes hyperaccumulatrices (<i>A. halleri</i> et <i>N. caerulescens</i>) pour hyperaccumuler le Zn.	31
Figure 9 : Transport des ETMs à travers la racine	33
Figure 10 : Voie de biosynthèse des phytochélatines	37
Figure 11 : Proposition de modèles représentant les différentes familles de MTs.	39
Figure 12 : Digue de Touissit recouverte par du stérile et revégétalisée avec du pin et de l'acacia.	54
Figure 13 : Digue de Boubker recouverte partiellement par du stérile sur les côtés.	55
Figure 14 : Fonderie de Oued el Himer entourée de dépôt de scories.	55
Figure 15 : Fonderie de Oued el Himer, pinède et couloir sous le vent dominant.	56
Figure 16 : Concentrations en Pb (en mg/Kg de MS) dans les feuilles des sept plants d' <i>Hirschfeldia incana</i> prélevés sur les scories de la fonderie de Oued el Himer.	59
Figure 17 : Dendrogramme upgma réalisé à partir de l'alignement de la séquence de l'espaceur intergénique (ITS).	60
Figure 18 : <i>H. incana</i> poussant directement sur les scories de la fonderie.	60
Figure 19 : Siliques d' <i>Hirschfeldia incana</i> (A) et de <i>Rapistrum rugosum</i> (B).	61
Figure 20 : Plantules d' <i>A. thaliana</i> cultivées pendant 13 jours en milieu gélosé contenant des concentrations croissantes en Pb(NO ₃) ₂ .	107

Figure 21 : Longueur de la racine primaire (en cm) de plantules d' <i>A. thaliana</i> cultivées pendant 13 jours en milieu gélosé en fonction de la concentration en $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ dans le milieu de culture.	107
Figure 22 : Plantules de <i>H. incana</i> , âgées de 4 semaines, après 3 jours de culture en milieu BD avec 100 μM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ à gauche ou sans $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ à droite.	108
Figure 23 : Plantules de <i>A. thaliana</i> (Col-0), âgées de 4 semaines, après 3 jours de culture en milieu BD avec 40 μM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ à gauche ou sans $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ à droite.	109
Figure 24 : Validation des données d'expression obtenues à partir de la puce hétérologue <i>Hirschfeldia incana/Arabidopsis thaliana</i> .	113
Figure 25 : Nombre de gènes d' <i>H. incana</i> dont l'expression est significativement régulée par le Pb dans les parties aériennes (PA) et les racines (RAC).	114
Figure 26 : Nombre de gènes d' <i>A. thaliana</i> dont l'expression est significativement régulée par le Pb dans les parties aériennes (PA) et les racines (RAC).	114
Figure 27 : Nombre de gènes d' <i>H. incana</i> (Hi) et d' <i>A. thaliana</i> (At) dont l'expression est significativement régulée ($\text{FC} > 2$ ou $< 0,5$) au niveau des parties aériennes (A) et des racines (B).	115
Figure 28 : Répartition par catégorie fonctionnelle des gènes qui sont sur-exprimés (FC puce $> 2,0$) chez <i>H. incana</i> au niveau des parties aériennes (A) et des racines (C), et chez <i>A. thaliana</i> , au niveau des parties aériennes (B) et des racines (D).	117
Figure 29 : Expression relative des gènes candidats mesurée par QPCR au niveau des parties aériennes (PA) et des racines (RAC) d' <i>H. incana</i> (barre grise) et d' <i>A. thaliana</i> (barre blanche).	129
Figure 30 : Localisation de l'insertion des ADN-T dans les lignées mutantes.	131
Figure 31 : Effets du Pb sur la longueur de la racine primaire sur des plantules d' <i>A. thaliana</i> de la lignée sauvage et des lignées mutantes.	133
Figure 32 : Teneur en Pb au niveau des parties aériennes (A) et des racines (B) des mutants d' <i>A. thaliana</i> âgées de 4 semaines traitées pendant 10 jours avec 40 μM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ en culture hydroponique.	133
Figure 33 : Schéma hypothétique des mécanismes moléculaires de la tolérance au Pb chez <i>H. incana</i> .	152

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales caractéristiques du Pb.	13
Tableau 2 : Classement des techniques de dépollution en fonction de la technique utilisée.	24
Tableau 3 : Teneurs en ETM (en mg/Kg de MS) dans les feuilles des plantes prélevées sur les différents sites d'étude.	58
Tableau 4 : Dosage du Pb dans les parties aériennes (PA) et les racines (RAC) d' <i>Hirschfeldia incana</i> et d' <i>Arabidopsis thaliana</i> après 3 jours de culture en hydroponie sur un milieu contenant respectivement 100 et 40 μM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$.	109
Tableau 5 : Comparaison des données d'expression de 31 gènes d' <i>H. incana</i> obtenues avec la puce <i>A. thaliana</i> et avec la QPCR	111
Tableau 6 : Comparaison des données d'expression de 7 gènes d' <i>A. thaliana</i> obtenues avec la puce et avec la QPCR	112
Tableau 7 : Liste des gènes candidats d' <i>H. incana</i> au niveau des parties aériennes	119
Tableau 8 : Liste des gènes candidats d' <i>H. incana</i> au niveau des racines.	121
Tableau 9 : Liste des gènes candidats chez <i>H. incana</i> , classés par catégorie fonctionnelle (MapMan), au niveau des parties aériennes (PA) et des racines (R).	126
Tableau 10 : Gènes candidats retenus pour une analyse fonctionnelle.	128
Tableau 11 : Caractérisation des séquences ORF des gènes candidats.	130
Tableau 12 : Insertions et lignées mutantes correspondant aux gènes candidats.	131
Tableau 13 : Amorces utilisées pour la Q-PCR sur les ADNc d' <i>H. incana</i> .	162
Tableau 14 : Amorces utilisées pour la Q-PCR sur les ADNc d' <i>A. thaliana</i> .	162
Tableau 15 : Amorces utilisées pour la validation par Q-PCR de la puce à ADN.	163
Tableau 16 : Amorces utilisées pour le clonage des ADNc d' <i>H. incana</i> .	165
Tableau 17 : Amorces utilisées pour la RACE-PCR.	166
Tableau 18 : Amorces utilisées pour le clonage GATEWAY.	167
Tableau 19 : Amorces utilisées pour vérifier la présence de l'insertion sur les ADN des lignées mutant d'insertion d' <i>A. thaliana</i> .	168

Chapitre 1

Introduction

1) Le plomb : Définition

Le plomb (Pb), du latin *plombum*, est un métal mou, gris et sans odeur, ni goût caractéristique. Il a pour numéro atomique 82 et appartient au groupe IV b de la classification périodique des éléments. Sa masse atomique est $207,2 \text{ g.mol}^{-1}$, sa densité 11,35 et sa température de fusion 327°C . Le Pb est un élément chalcophile qui se trouve dans la croûte terrestre le plus souvent sous forme de galène (tab. 1). Le fait qu'il possède 2 électrons non appariés sur sa dernière couche électronique (p) lui permet d'avoir 2 formes cationiques : Pb^{2+} et Pb^{4+} .

Le terme de métal lourd a été utilisé pendant de nombreuses années pour définir entre autre, le Pb, mais cette appellation ne correspond à aucune définition précise (densité, propriétés chimiques, N° atomique etc. ; Duffus, 2002). Il est plus judicieux d'utiliser le terme d'élément trace métallique (ETM) en rapport avec sa présence dans la croûte terrestre.

Tableau 1 : Principales caractéristiques du Pb.

Symbole	Pb
Masse atomique	$207,2 \text{ g mol}^{-1}$
Densité	11,35
Température de fusion	327°C
Principal minerai d'origine	Galène

2) Le plomb dans l'environnement

2-1) Origine naturelle

Le Pb se trouve habituellement en faible quantité au niveau de la croûte terrestre (0,002%). Il est rare à l'état natif mais est présent, le plus souvent, sous forme de galène (PbS) mais aussi de cérusite (PbCO_3) et d'anglésite (PbSO_4). Les sulfures et les carbonates sont altérables et peuvent être dispersés dans l'atmosphère par l'érosion des roches par le vent ou suite à une éruption volcanique. Les roches contenant du Pb peuvent être aussi érodées par la pluie et du Pb peut ainsi se retrouver via les cours d'eau au niveau des surfaces agricoles.

2-2) Origine anthropique

Le Pb a été l'un des premiers métaux utilisés par l'homme dès l'âge du bronze, il y a plus de 6000 ans (fig. 1). Du fait de ses caractéristiques physico-chimiques (densité élevée, bas point de fusion, grande malléabilité, résistance à la corrosion et imperméabilité), il a été

largement utilisé, dès l'Antiquité, comme pigment ou conservateur (oxyde de plomb) ou pour réaliser des canalisations, des toitures, de la vaisselle, des pièces de monnaie, des produits cosmétiques ou encore pour adoucir les aliments et le vin. Suit alors, entre 400 et 900 apr. J.-C., une longue période de récession. De 900 à 1200 apr. J.-C., l'exploitation est relancée par la réouverture d'anciennes mines et la découverte de nouvelles minéralisations en Autriche, en Tchéquie, en Grande-Bretagne, et surtout en Allemagne dans les montagnes du Harz. En 1200, la production chute et atteint un minimum durant la peste noire (1350) qui décima près de 25 % de la population européenne. On retrouve une nouvelle période d'expansion jusqu'en 1530, puis une baisse de la production pendant laquelle une partie des ressources a été importée des Amériques. L'utilisation du Pb a été amplifiée au cours de la Révolution industrielle (fig. 1).

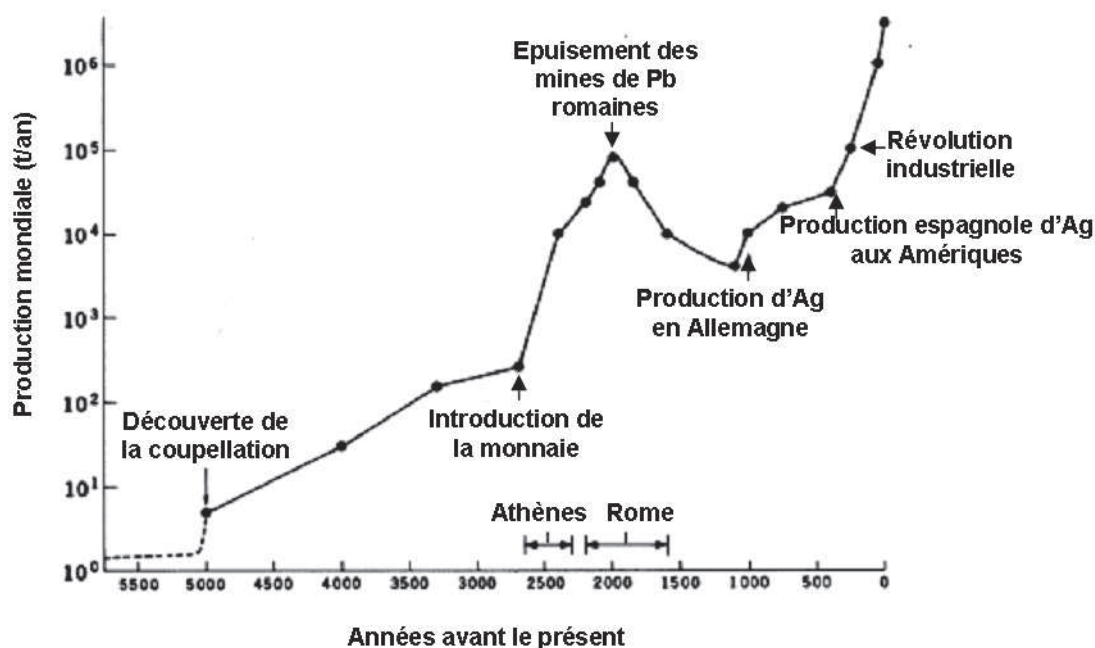


Figure 1 : Production de Pb dans le monde au cours des 5000 dernières années (d'après Settle & Patterson, 1980).

Ainsi, pendant la première partie du XX^{ème} siècle, il a été utilisé dans l'industrie, l'imprimerie et les peintures. Dans la seconde moitié du siècle, l'utilisation principale du Pb était liée aux carburants automobiles (ajout de Pb dans l'essence comme antidétonant) et comme principal composant des accumulateurs. A partir des années 70, la prise en compte des effets délétères du plomb sur l'environnement et la santé, en parallèle avec le développement de nouvelles technologies, a conduit les pays industrialisés à légiférer sur la limitation puis

l'interdiction du Pb dans les carburants. Ainsi, la présence du Pb dans l'air a été très fortement réduite à partir de 01 janvier 1996 suite à l'arrêt de l'utilisation des essences plombées (fig. 2). En France, la part de l'émission de Pb due aux transports routiers est passée de 91,2% de l'émission totale en 1996 à 3% en 1999 pour complètement disparaître (CITEPA, 2011). L'impact de cette pollution atmosphérique reste toujours présent au regard des grandes quantités de Pb qui ont été mesurées au bord des routes et des autoroutes (Lagerwerff, 1971).

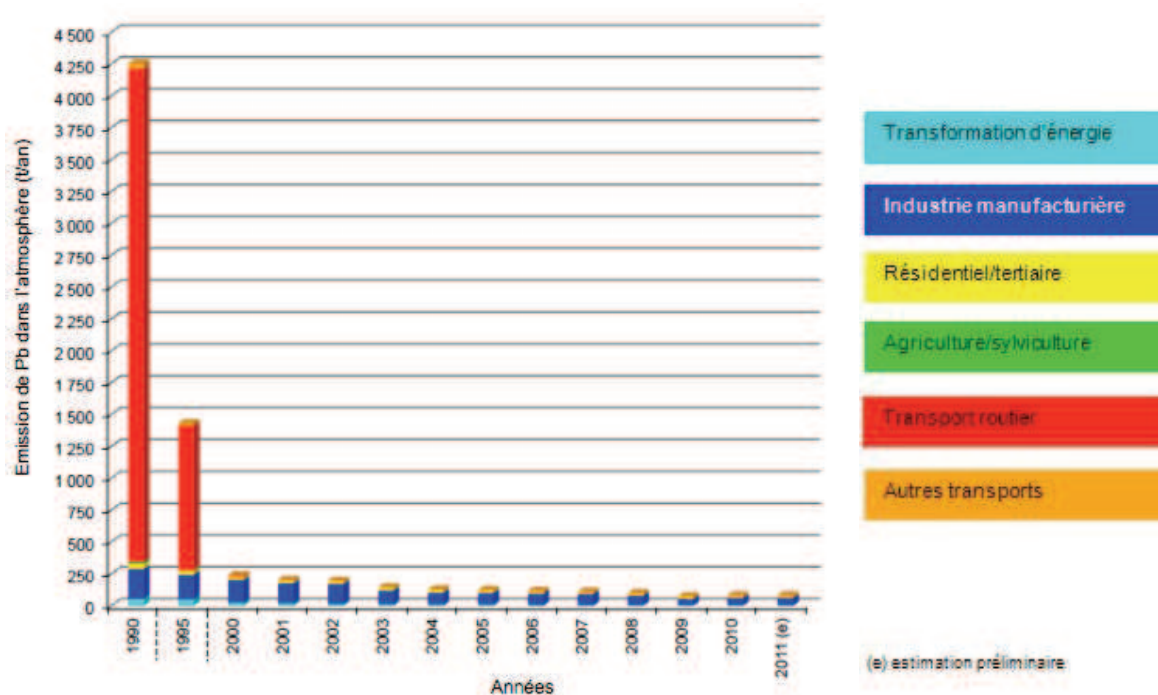


Figure 2 : Répartition et évolution de l'émission de Pb dans l'atmosphère en France en t (CITEPA, 2012).

Dès 1948, l'utilisation de peintures contenant du Pb (blanc de céruse) a été interdite pour les professionnels mais pas pour les particuliers. Ce n'est que plus tard, en 1993, que les peintures au Pb ont été totalement interdites. De même, des directives européennes imposant le remplacement de toutes les canalisations en Pb sont intervenues en 2003.

L'Arséniate de Pb a été largement utilisé dans l'agriculture comme pesticide et insecticide en particulier en arboriculture (jusque dans les années 50). Cette pollution n'est pas négligeable puisque la quantité de Pb épandue sur les vergers représenta de 4 à 8,7 Kg/ha/an pendant plus d'un demi-siècle (He *et al.*, 2005).

Aujourd'hui, 80% du Pb est utilisé pour la fabrication des batteries et il est entièrement recyclable (Source « International Lead and Zinc Study Group »). Les accumulateurs restent actuellement la principale utilisation du plomb. Les batteries au plomb

sont constituées de 2 électrodes, une positive ($\text{PbO}_2/\text{PbSO}_4$) et une négative (Pb/PbSO_4) immergées dans une solution d'acide sulfurique (H_2SO_4). Une batterie est constituée de plus de 50 % de Pb.

La principale source de pollution de l'environnement par le Pb provient de l'activité minière (extraction et fonderies) et des déchets qu'elle génère. Cette source de contamination s'est progressivement déplacée de l'Europe vers les pays émergents ou en voie de développement. En Europe, les sociétés qui exploitent les mines ont eu l'obligation de les réhabiliter après l'arrêt de l'exploitation (Directive 2006/21/EC, Article 20). Les pays émergents sont confrontés à ces problèmes de pollution car de nombreux sites ont été abandonnés dans l'état par les sociétés, souvent européennes, qui les exploitaient.

L'activité minière perturbe énormément l'environnement dès le début de l'exploration des sites potentiels avec la destruction de l'habitat naturel. Ensuite, l'exploitation se poursuit par l'extraction du minerai et, selon la position du filon, la mine sera à ciel ouvert ou souterraine. Il est bien évident que les mines à ciel ouvert ont plus d'impact direct sur l'environnement que les mines souterraines. Toutefois, dans ces 2 types d'exploitation, une grande quantité de sol ou de roches (morts terrains) doit être déplacée pour atteindre le filon. Ces morts terrains sont la plupart du temps déposés aux abords des exploitations. Quel que soit le type de mine, le traitement du minerai de Pb (le plus souvent sous forme de galène) suit toujours le même procédé. La première étape est le concassage en particules très fines puis l'enrichissement en utilisant, comme procédés, la gravimétrie et/ou la flottation (selon la taille des minéraux) qui utilisent les différences d'hydrophobicité des métaux à séparer. Ces traitements sont réalisés aux abords des mines dans les laveries. La quantité de déchets produits est très importante puisqu'elle représente de 88 à 99 % de la roche extraite. Ces déchets, issus de ces traitements, contiennent encore des quantités non négligeables de Pb avec des teneurs en Pb allant de 1 à 12%. Les déchets sont déposés en couches successives via des tuyaux et forment après assèchement de gigantesques digues (haldes) à proximité des sites d'exploitation (fig. 3). Le Pb contenu dans ces terrils est soumis à l'érosion du vent et de la pluie. Les particules, en suspension dans l'air, peuvent être inhalées mais elles peuvent aussi se déposer sur des terres cultivables contaminant ainsi les sols et les végétaux. Le Pb, lessivé par la pluie, va se retrouver dans les cours d'eau et les nappes phréatiques. Le concentré de Pb, issu du traitement, qui contient près de 60 à 80 % de Pb, est, lui, acheminé vers une fonderie. La première étape de la métallurgie est le grillage qui permet l'élimination du soufre. Ensuite, la réduction se passe dans les fours à cuve grâce au carbone et à l'oxyde de carbone. On obtient, après ce traitement, le Pb d'œuvre qui contient encore d'autres métaux

(Cu, As, Ag, Zn, etc. ...) et, comme déchets, des scories très riches en Fe qui contiennent également près de 1 à 3 % de Pb. Le Pb d'œuvre va finalement être affiné pour éliminer les métaux résiduels. Dans le traitement de seconde fusion (recyclage), la matière première est différente et l'affinage ne comporte pas de grillage.



Figure 3 : Digue de déchets miniers provenant de l'extraction du Pb à proximité du village de Touissit, Maroc.

3) Le plomb et la santé humaine

En raison de son niveau de toxicité, de nombreuses utilisations du Pb ont été progressivement interdites dans les pays industrialisés mais cet élément toxique reste encore largement présent dans les sols agricoles, les logements anciens et insalubres ainsi que dans certains produits à usage domestique (peintures, vernis, canalisations,...). Chez l'homme, la contamination par le Pb peut se faire par plusieurs voies (fig.4) :

- par ingestion d'aliments contaminés (végétaux, tissus ou liquides d'origine animale), de déchets de peintures (réflexe main/bouche chez les jeunes enfants) et d'eau par les réseaux de canalisations de distribution d'eau anciennes contenant du Pb,
- par inhalation de poussières contenant du Pb (gaz d'échappement, activité minière et métallurgique, activités industrielles comme le recyclage des batteries, ...).

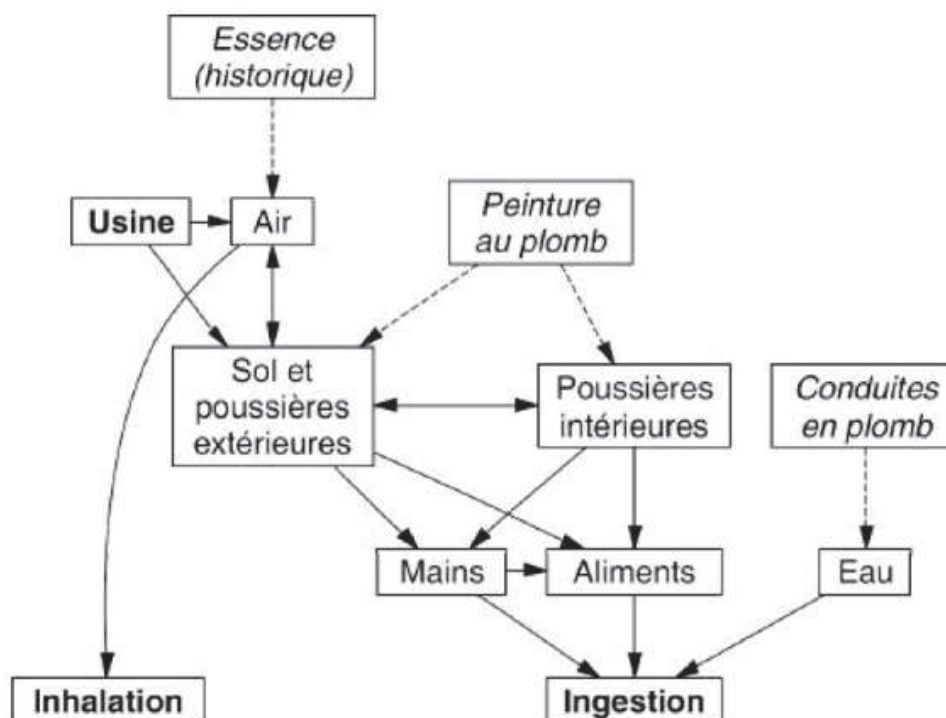


Figure 4 : Voies de contamination de l'homme par le Pb (Doumas, communication personnelle).

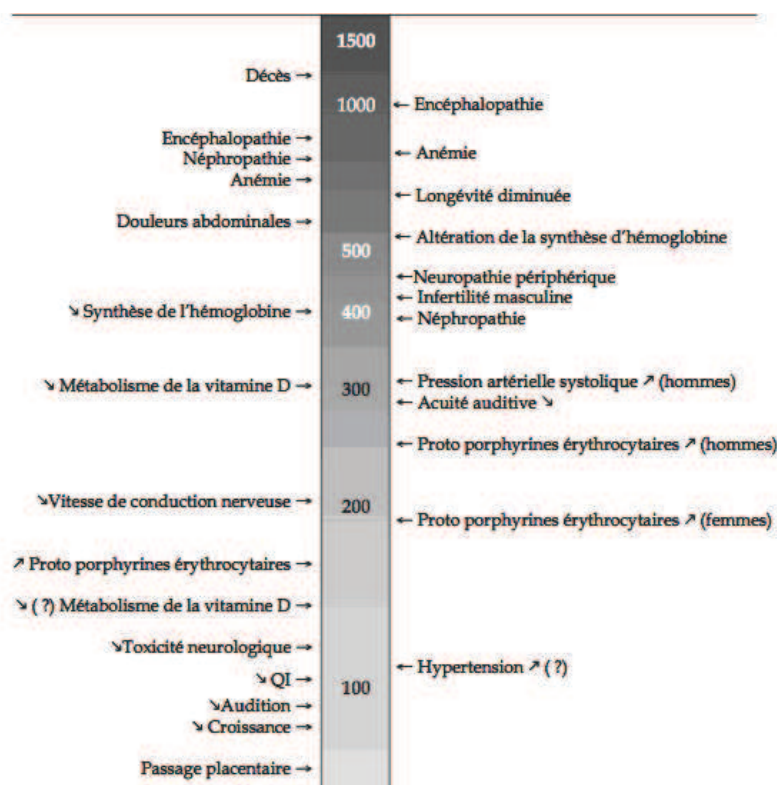


Figure 5 : Effets du Pb sur la santé humaine en fonction de la concentration en Pb en µg/L de sang (INSERM, 2008).

Une fois dans l'organisme, le Pb se concentre, via la circulation sanguine, dans le cerveau et les os. Il disparaît rapidement des tissus mous (30 jours) mais il est stocké sur plus

long terme dans les os (10 à 20 ans). Chez l'homme, l'intoxication chronique au Pb induit le saturnisme. Les enfants sont plus vulnérables que les adultes car le Pb a un impact important sur le cerveau en développement. Ainsi, le Pb cause de nombreux troubles lorsqu'il dépasse 100 µg/ L de sang, en particulier des troubles neurologiques chez les enfants (fig.5). Il a été constaté une baisse de 1 à 3 points du Q.I. pour une augmentation de 100 µg/L de sang de la plombémie. Les femmes enceintes sont également une population à risque puisque le Pb passe la barrière placentaire et peut causer des dégâts sur l'embryon. Les adultes peuvent aussi être atteints et développer, au-delà de 300 µg/L de Pb dans le sang, différentes pathologies : atteinte rénale, anémie, hypertension artérielle, atteinte du système nerveux central et périphérique (source INSERM).

En Europe et aux Etats-Unis, grâce à une législation plus drastique qui a permis de supprimer la présence en Pb dans l'essence, la peinture, les tuyaux et de réduire les émissions de Pb par les industriels, le niveau d'exposition de la population a été divisé par 2 (Thornton *et al.*, 2001). Actuellement, il est admis que le Pb ne présente plus un danger direct pour la population. Toutefois, la pollution par le Pb présente dans les sols va perdurer pendant des centaines d'années si aucune action n'est envisagée. De plus, dans des pays où la législation est plus souple, voire inexistante, les populations les plus fragiles courent encore le risque d'être exposées à des quantités importantes de Pb.

Selon certaines estimations, les ressources en Pb sont loin d'être épuisées et il resterait environ 80 000 000 kt de Pb encore disponible. Face à une demande toujours grandissante, l'extraction du Pb a explosé en Asie et, notamment, en Chine où elle est passée de 570 kt en 2001 à 1750 kt en 2011 (Mineral Commodity Summaries, 2011). L'extraction et la métallurgie du Pb ont de beaux jours devant eux sachant que la consommation mondiale de Pb ne fait qu'augmenter (+22,2 % entre 2001 et 2006 ; Michel, 2007). Il y aura malheureusement toujours des contaminations de l'environnement au cours de cette production.

4) Principaux effets du plomb sur les plantes

A faible dose, les premiers effets visibles mais non spécifiques du Pb sur une plante sont l'inhibition de la croissance racinaire, la chlorose des feuilles et un retard de croissance de la plante (Burton *et al.*, 1984). A plus forte dose, il peut provoquer la mort cellulaire (Seregin & Ivanov, 2001).

4-1) Equilibre hydrique de la cellule

Une exposition au Pb va diminuer la transpiration chez les végétaux. Cette diminution peut s'expliquer par plusieurs phénomènes. Cela peut être dû à une diminution de la croissance de la plante et donc à une diminution de la surface foliaire ou encore à la fixation du Pb à la paroi cellulaire qui va entraîner une diminution de la plasticité de celle-ci et modifier la pression osmotique (Barcelo & Poschenrieder, 1990). Il a été montré que la présence du Pb entraîne une accumulation d'ABA au niveau des parties aériennes, ce qui va provoquer la fermeture des stomates et diminuer la perte d'eau par transpiration (Parys *et al.*, 1998 ; Pourrut *et al.*, 2011).

4-2) Nutrition minérale

Il est connu que la présence de Pb perturbe l'absorption des éléments minéraux par la plante. Il a été montré, chez plusieurs plantes exposées au Pb, une diminution dans les feuilles de la concentration en cations divalents comme le Zn^{2+} , le Mn^{2+} , le Ca^{2+} et le Fe^{2+} (Seregin *et al.*, 2004 ; Chatterjee *et al.*, 2004 ; Kopyitke *et al.*, 2007). Cette diminution pourrait être due à une compétition entre le Pb et certains ions de taille équivalente au niveau des transporteurs membranaires. En effet, le Pb, qui a quasiment le même rayon que le K^+ , pourrait emprunter les canaux potassiques pour entrer dans la cellule (Sharma & Dubey, 2005).

4-3) Photosynthèse

L'inhibition de la photosynthèse est un des effets bien connus du Pb sur la plante (Islam *et al.*, 2008). Parmi les causes de l'altération de la photosynthèse, on peut citer une augmentation de l'activité de la chlorophyllase et, par conséquent, une dégradation des pigments chlorophylliens, en particulier, de la chlorophylle b qui est plus sensible que la chlorophylle a (Liu *et al.*, 2009). Il a été aussi montré qu'il existait une inhibition de la synthèse des pigments chlorophylliens (Cenkci *et al.*, 2010). L'affinité du Pb pour les protéines de la membrane entraîne, à des concentrations en Pb élevées, une déformation et une destruction de l'ultrastructure des chloroplastes (Islam *et al.*, 2008). De plus, parmi les facteurs qui vont inhiber la photosynthèse, on peut citer l'inhibition des enzymes du cycle de Calvin par le Pb (Liu *et al.*, 2008) ainsi que le remplacement par le Pb d'ions essentiels tels que le Mn et le Fe (Chatterjee *et al.*, 2004).

4-4) Respiration

Autant les effets du Pb sur la photosynthèse sont bien décrits, autant il y a peu d'études sur les effets du Pb sur la respiration. A faible concentration en Pb, il y a une augmentation de la respiration (Pourrut *et al.*, 2008). Comme la photosynthèse est inhibée, il pourrait s'agir de l'augmentation de la différence entre photosynthèse et respiration (Parys *et al.*, 1998). En effet, Romanoska *et al.* (2002) a observé une augmentation de la teneur en CO₂ au niveau des feuilles de *P. sativum* exposé au Pb. A plus forte concentration en Pb (20 mM), la respiration est inhibée (Koeppe *et al.*, 1977).

4-5) Génotoxicité

L'effet antimitotique est aussi un des effets bien connus du Pb (Shahid *et al.*, 2011) et ce depuis longtemps (Hammet *et al.*, 1928). Le Pb provoque un rallongement de l'interphase lors de la division cellulaire (Patra *et al.*, 2004). En se liant à la membrane et à la paroi, le Pb va augmenter la rigidité de la cellule et ralentir la division cellulaire. Il va agir aussi sur les microtubules et entraîner l'apparition de cellules anormales bloquées au stade de la métaphase.

4-6) Stress oxydatif

De nombreux stress abiotiques sont connus pour causer des dommages oxydatifs dans la cellule. Il a été montré que le Pb provoque directement ou indirectement la production d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) : peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), radical superoxyde (O₂⁻) et radical hydroxyle (OH⁻) (Malecka *et al.*, 2001 ; Verma & Dubey, 2003). Ces ROS, si elles ne sont pas neutralisées, vont causer des dommages irréversibles à différentes molécules comme les lipides membranaires, les acides nucléiques ou encore les pigments chloroplastiques. Des enzymes, comme la catalase, les superoxyde dismutases (SODs) et les peroxydases, vont participer à la dégradation des ROS. Il existe également une voie non enzymatique de neutralisation des ROS par le glutathion, la cystéine, l'acide ascorbique et le tocophérol (Verma & Dubey, 2003). Le Pb n'est pas un métal oxydo-réducteur, comme le fer par exemple, et son effet sera donc indirect (Sharma & Dubey, 2005). Il a été montré que le Pb, comme d'autres ETMs, induit des changements au niveau de la membrane cellulaire (Gupta *et al.*, 2009) et chloroplastique (Wu *et al.*, 2008).

5) Méthodes de dépollution des sols

5-1) Méthodes physico-chimiques

Les méthodes de dépollution peuvent être classées en fonction du lieu du traitement. Elles peuvent être mises en oeuvre directement sur le site pollué, ou hors de celui-ci (fig 6). Sur site, les sols pollués peuvent être excavés et traités sur place ou la pollution peut être traitée directement dans le sol ; il s'agira alors de traitement *in situ*. Le traitement peut aussi avoir lieu hors site. Les sols pollués sont alors excavés, transportés et traités hors du site de pollution. Le choix de la méthode va dépendre de l'étendue et du niveau de pollution et, bien sûr, du coût du traitement.

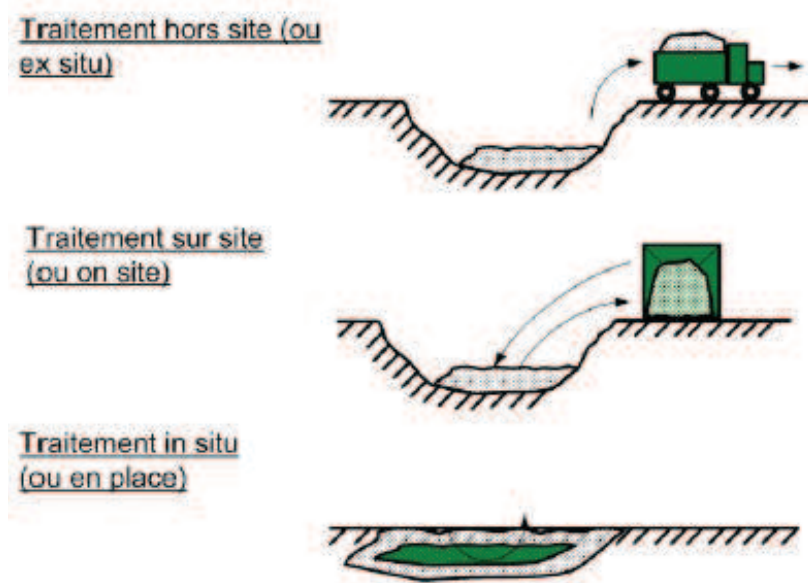


Figure 6 : Classement des techniques de dépollution des sols en fonction du lieu de traitement (BRGM, 2010).

Les méthodes de dépollution peuvent être classées également en fonction de la technique utilisée pour le traitement. On va distinguer principalement 4 méthodes (tab. 2).

5-1-1) Evacuation de la pollution

Sur site, le principe consiste à utiliser des fluides présents ou injectés (gaz ou eau) pour transférer la pollution vers des sites d'extraction ou d'immobilisation. Une des techniques utilisées, le « venting », consiste à mettre en dépression la zone polluée par des composés volatiles. La pollution peut être aussi évacuée par excavation puis traitée comme un déchet (mise en décharge de type déchets industriels à risque).

5-1-2) Piégeage de la pollution

Le confinement vise à limiter, voire supprimer, le contact du compartiment pollué avec les autres compartiments abiotiques (sol, eau et/ou air). Le transfert de pollution d'un compartiment à l'autre se fait par 3 vecteurs : hydrique, éolien et anthropique. Le confinement peut avoir lieu hors site (mise en décharge) ou sur site, la terre étant ou non excavée. Sur site, la technique consiste à empêcher toute pénétration d'eau par l'extérieur et à limiter toute migration de vapeurs du milieu pollué vers l'extérieur. La surface supérieure est imperméabilisée par une couverture étanche.

La solidification consiste à enfermer les polluants dans une matrice solide : il s'agit d'ajouter des réactifs à la terre polluée pour la transformer en un matériau solide, très peu perméable et non réactif, au sein duquel les polluants sont immobilisés. La solidification est effectuée par mélange *ex situ* ou injection *in situ* d'eau et de matériaux qui sont généralement des mélanges d'oxydes (chaux + oxyde de magnésium, silice, alumine et oxyde de fer).

La stabilisation a pour objet de réduire la mobilité des polluants en les rendant non solubles par réaction de précipitation, par la formation de complexes ou par adsorption sur une matrice solide. Le plomb peut, par exemple, être rendu insoluble par l'addition de phosphate trisodique (Hettiarachchi & Pierzinsky, 2002).

5-1-3) Procédés chimiques

Les procédés de traitement chimique mettent en jeu des produits chimiques soit en tant que réactifs, comme pour l'oxydation ou la réduction, soit pour l'extraction ou lavage.

L'oxydation chimique est un traitement *in situ* voire sur site *ex situ* visant à détruire les polluants organiques présents dans l'eau souterraine ou les sols sous l'action d'un oxydant chimique. La réduction *in situ* consiste à provoquer une réaction de réduction du polluant par injection d'un agent réducteur. Le principal réducteur est le fer (Fe^0) qui provoque notamment la déchloration des solvants chlorés.

Les traitements par lavage ont pour objectif d'extraire les polluants en lavant la terre excavée (*ex situ*) ou le sol (*in situ*) à l'aide d'un solvant approprié. Le solvant le plus économique est l'eau, mais elle ne suffit pas toujours. Dans ce cas, un solvant ou un tensioactif pourront être utilisés. Le lavage s'adresse aux polluants organiques.

5-1-4) Procédés thermiques et électriques

Les procédés thermiques consistent à porter la terre polluée à haute température afin d'oxyder les polluants au stade ultime. Le plus utilisé est la désorption thermique. La

désorption thermique est une technique *ex situ* ou hors site, consistant à provoquer par voie thermique, la désorption et/ou la volatilisation des polluants. En effet, l'augmentation de température induit l'augmentation de la pression de vapeur des polluants et favorise ainsi leur désorption. Cette technique n'est pas adaptée aux pollutions par les métaux lourds.

Les procédés électriques utilisent le courant électrique pour porter le sol à haute température (vitrification) ou pour mobiliser et extraire les polluants (électroremédiation).

Tableau 2 : Classement des techniques de dépollution en fonction de la technique utilisée.

	In situ	Hors site
Evacuation	Venting	Excavation Mise en décharge Lavage
Piégage	Confinement Solidification Stabilisation	Solidification Stabilisation
Chimique	Lavage Oxydation chimique Réduction chimique Vitrification	Lavage Oxydation chimique Réduction chimique Vitrification
Thermique	Désorption	Désorption Incinération
Electrique	Mobilisation Vitrification	Mobilisation Vitrification

Pour des raisons économiques et également sociétales, malgré l'éventail des procédés disponibles, la dépollution des sols a encore largement recours au confinement et à l'excavation.

Les méthodes physico-chimiques de dépollution des sols présentent l'inconvénient d'être souvent coûteuses et lourdes à mettre en œuvre. De plus, elles perturbent fortement l'activité biologique des sols et altèrent profondément leur structure physique, chimique et biologique.

5-2) Bioremédiation

Le besoin de nouvelles techniques, économiquement compétitives et pouvant préserver les caractéristiques du sol, s'est fait sentir. Ces techniques, regroupées sous le terme générique de bioremédiation, font appel soit à des microorganismes et aux produits de leur métabolisme, soit à des végétaux supérieurs et aux bactéries de leur rhizosphère pour aboutir

à la phytorestauration du milieu pollué (Cunningham *et al.*, 1995 ; Pilon-Smits, 2005). La bioremédiation peut être utilisée en complément des procédés physico-chimiques présentés ci-dessus.

Les bactéries sont utilisées depuis longtemps pour leurs propriétés remarquables : lixiviation des métaux, oxydation de composés soufrés, oxydo-réduction de l'arsenic, dégradation de composés organiques. Comme exemple de dépollution par les bactéries, on peut citer l'utilisation d'*Alcanivorax borkumensis* pour éliminer les nappes de pétrole (Gertler *et al.*, 2009) ou la bio-immobilisation du sélénium par réduction indirecte par des bactéries telluriques du genre *Clostridium* (Le Cloirec & Andrès, 2005).

Le terme phytoremédiation désigne spécifiquement l'utilisation des plantes dans des projets de dépollution des sols.

Nous ne développerons dans ce paragraphe que la dépollution par les plantes des polluants inorganiques dont font partie les ETMs en se focalisant plus particulièrement sur le Pb. Cette méthode a deux avantages principaux : elle est peu coûteuse puisque le traitement se fait sur site et elle est respectueuse de l'environnement. Cette méthode de phytomanagement permet ainsi de revégétaliser les sites pollués en améliorant, en plus, la qualité visuelle de l'espace aménagé. Selon le type de compartiment abiotique (sol, air ou eau), la nature du polluant et de sa biodisponibilité, différents procédés peuvent être mis en œuvre (fig. 7). Les polluants inorganiques peuvent être stabilisés au niveau de la rhizosphère : il s'agira alors de phytostabilisation. Ils peuvent être stockés dans la plante au niveau des feuilles : il s'agira alors de phytoextraction. Et, enfin, ils peuvent être volatilisés (cas du Se) *in situ* et rejetés dans l'atmosphère dans le cas de la phytovolatilisation. Le système racinaire de certaines plantes peut être utilisé pour filtrer les eaux polluées dans le cas de la rhizofiltration.

Quelque soit le procédé utilisé, celui-ci nécessite l'utilisation de plantes ayant des caractéristiques particulières. Une des premières caractéristiques est la tolérance au polluant. En effet, les plantes doivent pouvoir croître et se reproduire sur des sols pollués.

La plupart des plantes tolérantes sont des « excluders », c'est-à-dire qu'elles limitent au maximum le transfert des ETMs de la racine à la feuille pour que la photosynthèse ne soit pas perturbée (Verbruggen *et al.*, 2009).

Les plantes tolérantes, qui ne sont pas des « excluders », vont stocker les ETMs au niveau des feuilles dans des compartiments cellulaires (vacuole) où ils ne risquent pas de perturber le métabolisme de la plante. Ces plantes sont dites accumulatrices.

Parmi ces plantes tolérantes et accumulatrices, il existe un petit nombre de plantes dites hyperaccumulatrices (≈ 450 plantes soit 0,2 % des angiospermes ; pour revue Kramer,

2010) qui vont pouvoir accumuler de grandes quantités d'ETMs au niveau de leurs feuilles sans aucun signe physiologique de stress. Ces plantes hyperaccumulatrices peuvent accumuler 100 à 1000 fois plus d'ETMs au niveau de leurs feuilles que des plantes non-accumulatrices, poussant dans les mêmes conditions. Le seuil pour lequel une plante est considérée comme hyperaccumulatrice varie selon l'ETM considéré (Baker & Brooks, 1989) :

- < à 0,01% de la matière sèche pour le Cd et le Se.
- < à 0,1% de la matière sèche pour le Ni, As, Co, Cu, Cr, Pb
- < à 1% de la matière sèche pour le Zn et le Mn

La plupart des plantes hyperaccumulatrices décrites dans la littérature sont des hyperaccumulatrices de Zn. Un des modèles de plante hyperaccumulatrice de Zn/Cd, le plus décrit, est *Noccaea cearulescens*. Cette brassicacée peut accumuler jusqu'à 39,6 g de Zn/Kg de MS et 2,9 g de Cd/Kg de MS (Reeves & Brooks, 1983 ; Reeves *et al.*, 2001).

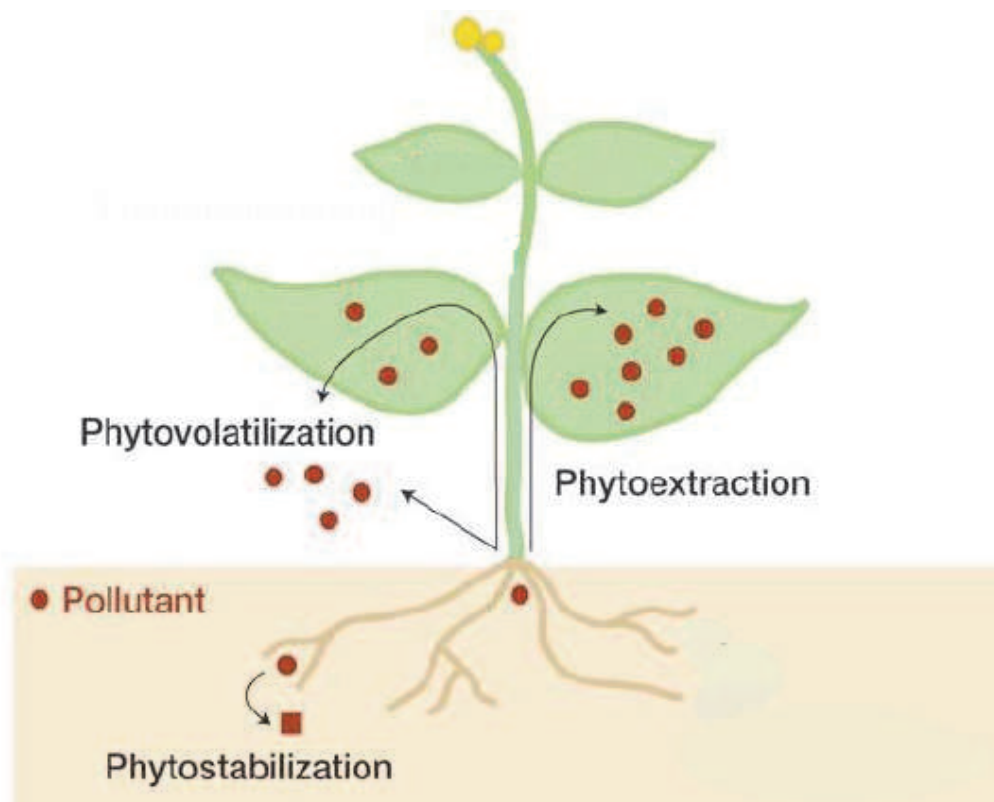


Figure 7 : Devenir des polluants inorganiques (point rouge) en fonction de la méthode de phytoremédiation utilisée. Le polluant peut être stabilisé dans la rhizosphère, il peut être séquestré à l'intérieur de la plante ou bien volatilisé (d'après Pilon-Smits, 2005).

L'autre critère rentrant dans la définition d'une plante hyperaccumulatrice est qu'elle accumule plus d'ETM dans les feuilles que dans les racines (Kramer, 2010). De ce critère,

découle le calcul du facteur de translocation (TF). Le TF d'un ETM donné pour une plante donnée est le rapport entre la concentration en ETM dans les feuilles et la concentration en ETM dans les racines. Ce facteur est très largement supérieur à 1 pour les plantes hyperaccumulatrices (Mattina *et al.*, 2003 ; Tanhan *et al.*, 2007).

5-2-1) Phytoextraction

Elle est basée sur la capacité des plantes à prélever les métaux au niveau de leurs racines et à transporter ces métaux des racines vers les feuilles où ils vont être stockés, principalement au niveau des vacuoles (McGrath & Zao, 2003). Le but de la phytoextraction est d'obtenir en fin de traitement un sol « propre ». Les plantes hyperaccumulatrices de métaux sont des bons candidats pour la phytoextraction (ex : *Noccaea cearulescens*, Schwartz *et al.*, 2003). Cependant, l'efficacité de la phytoextraction va dépendre de deux facteurs : le facteur de bioconcentration et la production de biomasse (McGrath & Zao, 2003).

Le facteur de bioconcentration (FBC) est le rapport entre la concentration en métal dans les feuilles et la concentration en métal dans le sol. Il représente la capacité de la plante à accumuler les métaux au niveau des feuilles à partir du sol (McGrath & Zao, 2003). Ainsi, à l'exception des plantes hyperaccumulatrices, la plupart des plantes ont un $FBC < 1$ et il faudrait plus qu'une vie d'homme (génération) pour diviser par 2 la pollution d'un sol en utilisant ces plantes (Peuke & Rennenberg, 2005).

Le deuxième point est la production de biomasse. En effet, parmi les plantes qui ont un $FBC > 1$, c'est à dire les plantes hyperaccumulatrices, seules les plantes qui ont une forte production de biomasse (plusieurs dizaines de tonnes par ha) pourront être utilisées dans des programmes de phytoextraction pour que le projet soit économiquement réalisable. Peuke & Rennenberg (2005) suggèrent d'utiliser des plantes qui ont un FBC supérieur à 20 et une production de biomasse de 10 t/ha ou des plantes qui ont un FBC de 10 et une production de biomasse de 20 t/ha. La plupart des plantes hyperaccumulatrices présentent une faible production de biomasse, comme par exemple *N. cearulescens* qui produit seulement 2,5 t/ha de biomasse. Cependant, comme le FBC va compenser cette faible production de biomasse, elle pourra être utilisée dans des programmes de phytoremédiation de sols faiblement pollués par du Zn. En effet, son FBC varie de 1 pour des sols très pollués à 30 pour des sols peu pollués par le Zn (McGrath *et al.*, 2006). Il existe toutefois des plantes hyperaccumulatrices qui ont une production de biomasse importante comme *Berkheya coddii*, hyperaccumulatrice de Ni (Robinson *et al.*, 1997) ou encore *Pteris vittata*, hyperaccumulatrice d'As (Ma *et al.*, 2001).

Avec cette méthodologie, les plantes récoltées sont considérées comme des déchets industriels à risque et cela nécessite la mise en place d'une filière de traitement spécifique. C'est un facteur important à prendre en considération car cette filière n'est pas toujours opérationnelle dans les pays du Sud. Cependant, il existe un débouché intéressant qui peut être envisagé : la récupération du métal présent dans les feuilles à des fins de recyclage (« phytomining »). Plus le prix de vente de l'ETM est important et plus il va être intéressant d'utiliser le « phytomining ». Plusieurs plantes hyperaccumulatrices pourraient être utilisés dans des programmes de « phytomining », comme *Alysum murale* pour le Ni (Barbaroux *et al.*, 2009) et *B. juncea* pour l'or (Vara Prasad & De Oliveira Freitas, 2003).

Près d'une quarantaine d'essais de phytoextraction d'ETMs ont été recensés en Europe (Vangrosveld *et al.*, 2009). La plupart concernent le Cd, le Cu et le Zn et, dans une moindre mesure, le Pb (5 sites). On retrouve, bien sûr, des plantes hyperaccumulatrices dans ces essais tels que *N. cearulescens*, *A. halleri*, *B. juncea*, *A. murale*, ou des plantes de grande culture comme *Zea mays* et *Helianthus annuus*, mais aussi des arbres comme *Alnus incana* et *Alnus glutinosa*.

5-2-2) Phytostabilisation

Il ne s'agit pas d'une méthode de dépollution à proprement parler puisqu'il s'agit de l'utilisation de plantes et des bactéries de leur rhizosphère pour diminuer la mobilité des ETMs dans le sol et éviter leur dispersion par l'érosion. Les ETMs ne vont pas être éliminés mais, sous l'action des plantes, ils vont être immobilisés. Cette technique nécessite l'utilisation de plantes pour immobiliser les polluants dans les couches superficielles du sol en évitant, en particulier, leur migration dans les eaux de surface ou souterraine ou leur transfert sous forme particulaire dans l'atmosphère. Les plantes utilisées seront tolérantes aux polluants et présenteront un système racinaire bien développé. Les plantes peuvent soit absorber et stocker les ETMs au niveau de leur racine, soit les adsorber en surface.

Cette technique, le plus souvent couplée à un amendement des sols, va permettre de diminuer la biodisponibilité des ETMs et de favoriser la revégétalisation des sites. Différents amendements sont utilisés en fonction de la nature de la pollution. L'ajout de phosphate dans le sol entraîne la formation de précipités stables avec le Pb qui se traduit par une diminution de la biodisponibilité de cet ETM.

La phytostabilisation peut ne pas être une fin en soi mais être une étape transitoire du processus de dépollution d'un site. Elle doit, de toute façon, faire partie d'un processus de gestion de la dépollution sur le long terme. Cette technique de phytoremédiation pourrait être

celle qui aura le plus de succès parce qu'elle est simple à mettre en œuvre, elle n'est pas invasive et elle a un moindre coût (Vangronsveld *et al.*, 2009). Une trentaine d'essais aux champs ont été répertoriés en Europe en utilisant les plantes selon leur niveau de tolérance aux métaux mais aussi selon la zone à traiter (site minier, friche industrielle ou terre agricole), par exemple, *Festuca rubra*, *Helianthus annuus* et *Populus alba* (Vangronsveld *et al.*, 2009).

5-2-3) Phytovolatilisation

Elle concerne l'utilisation de plantes qui, via la transpiration, vont rejeter dans l'atmosphère les ETMs (As, Hg et Se) qu'elles ont prélevés, sous une forme moins toxique.

Banuelos *et al.* (2000) décrit des brassicacées comme *B. napus* et *B. juncea* capables de prélever le Se du sol et de le volatiliser sous sa forme réduite moins toxique. Des plants d'*Arabidopsis*, transformés avec le gène bactérien modifié *merA*, sont également capables de réduire le Hg^{2+} en Hg^0 et de le rejeter dans l'atmosphère (Rugh *et al.*, 1996).

5-2-4) Rhizofiltration

Elle est développée grâce à des plantes capables de prélever les polluants en milieu aqueux et de les stocker au niveau de leurs racines et/ou de leurs feuilles. Les bonnes candidates pour la rhizofiltration sont des plantes avec un niveau d'évapotranspiration élevé qui va permettre un important flux d'eau. Pour cette méthode, ce ne sont pas forcément des plantes aquatiques qui sont utilisées mais plutôt des plantes terrestres. Par exemple, *Helianthus annuus* est utilisé depuis de nombreuses années pour son potentiel à assainir les eaux polluées par l'uranium et le plomb (Dushenkov *et al.*, 1995 et 1997). Toutefois, on peut citer l'utilisation des roseaux associés à d'autres plantes pour former des jardins filtrants qui traitent les eaux usées en sortie de stations d'épuration à Honfleur par exemple (Société Phytorestore, France).

La jacinthe d'eau (*Eichhornia crassipes*), qui est considérée comme une plante invasive dans sa zone d'origine parce qu'elle prolifère sur les eaux polluées, par exemple du fleuve Niger, est utilisée dans les zones tempérées pour dépolluer les eaux des ETMs (Liao & Chang, 2004 ; Odjegba & Fassidi, 2007 ; Agunbiade *et al.*, 2009).

La fougère *Pteris vittata*, qui est capable en culture hydroponique d'accumuler de grandes quantités d'As (Wang *et al.*, 2002), est utilisée dans des programmes de phytorestauration des eaux polluées par l'As (Société Edenspace, USA).

Les techniques de phytoremédiation présentent, tout de même, quelques inconvénients. L'un des premiers est que ces procédés sont longs. En effet, la dépollution

d'un site peut prendre plusieurs années voire plusieurs dizaines d'années. Il faudrait, par exemple, 28 et 15 ans pour dépolluer avec *N. caerulescens* un site agricole pollué respectivement avec 38 ppm de Cd et 2100 ppm de Zn (McGrath *et al.*, 1997). Un autre inconvénient est que la pollution ne peut être traitée qu'en surface, de quelques dizaines de centimètres (utilisation des herbacées) à quelques mètres (utilisation des arbres) (Pilon-Smits, 2005). L'utilisation de plantes hyperaccumulatrices d'ETMs pour la dépollution peut entraîner l'introduction de ces ETMS dans la chaîne alimentaire si les plantes utilisées sont broutées par les animaux. La biodisponibilité du polluant dans le sol est un autre facteur important, dont va dépendre la dépollution. En effet, et c'est le cas pour le Pb, un métal peut être en grande quantité dans le sol mais être sous une forme peu biodisponible (assimilable) par la plante. Dans ce cas, l'ajout d'un agent chélatant comme l'EDTA, dans le sol, va augmenter de façon significative la concentration en Pb dans les feuilles (Huang *et al.*, 1996). Toutefois, l'ajout d'agent chélatant doit être utilisé avec prudence car, en favorisant la solubilisation du Pb dans le sol, il augmente le risque, pour ce polluant, de se disperser et de polluer les nappes phréatiques, par exemple.

Une autre voie explorée pour l'amélioration de la phytoremédiation est la transformation génétique de plantes par des gènes identifiés chez des plantes hyperaccumulatrices ou des bactéries. Par exemple, des plants de *Brassica juncea*, sur-exprimant un ABC transporteur AtATM3, ont montré une tolérance et une accumulation plus importante de Cd et de Pb (Bhuiyan *et al.*, 2011). Des essais au champ de phytoextraction du Cu sont menés en Russie et en Allemagne avec des peupliers gris (*Populus tremula* x *P. alba*) transformés avec le gène γ ECS d'*E.coli* (Peuke & Renneberg, 2005).

6) Mécanismes moléculaires de la tolérance au plomb

Les plantes ont mis en place un réseau complexe de mécanismes pour maintenir l'homéostasie des ETMs essentiels (Co, Cu, Mn, Mo, Ni et Zn) dans des limites physiologiques et pour réduire les effets néfastes de ceux qui ne le sont pas (As, Cd, Hg et Pb ; Clemens, 2001). Ce sont les mécanismes moléculaires de la tolérance et de l'accumulation du Zn qui sont les mieux décrits (fig. 8).

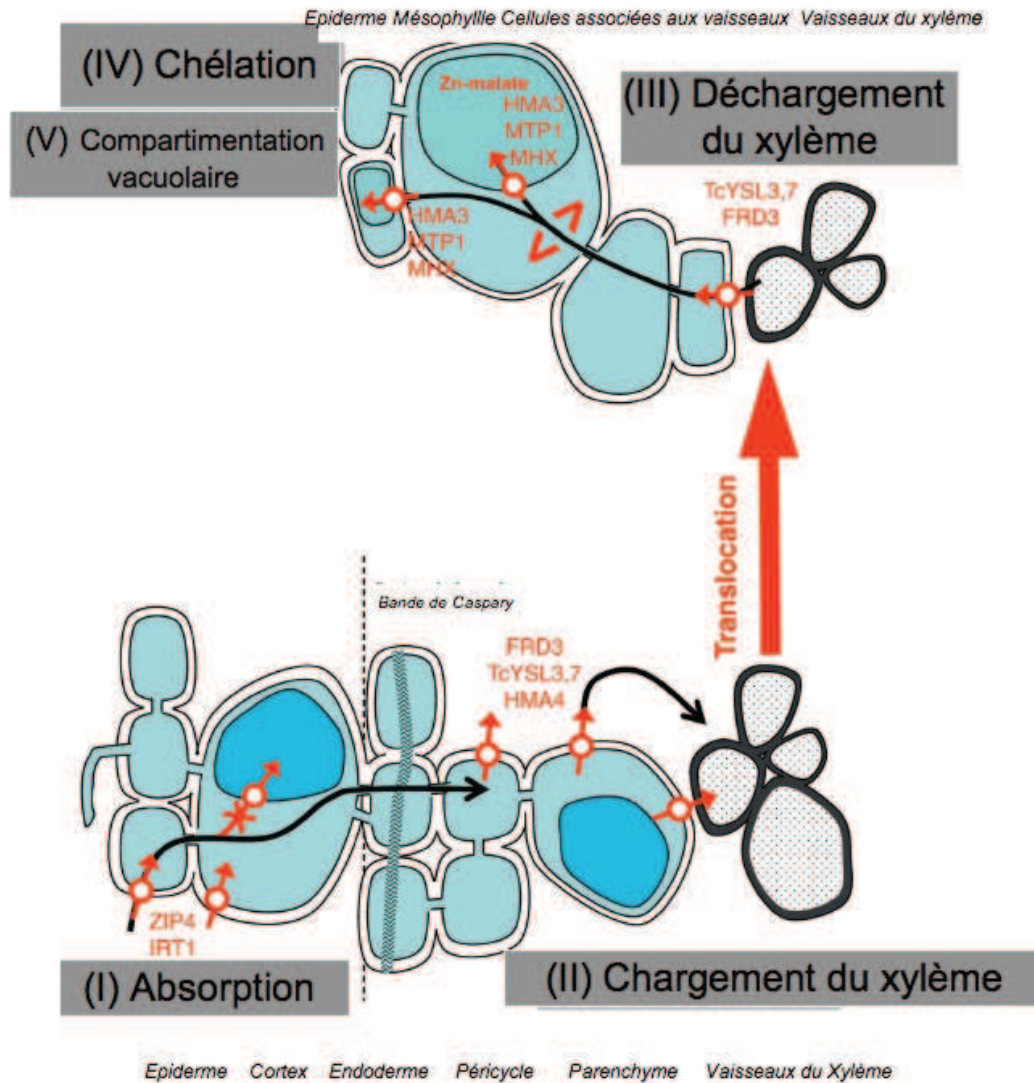


Figure 8 : Représentation schématique des principales adaptations mises en place chez les plantes hyperaccumulatrices (*A. halleri* et *N. caerulescens*) pour hyperaccumuler le Zn. Ces adaptations sont marquées en rouge, < > représente la chélation. (I) ZIP4 et IRT1 sont les 2 transporteurs identifiés. (II) Le chargement du Zn dans le xylème est lié à une diminution de la compartimentation vacuolaire au niveau des cellules du cortex et une augmentation de l'activité du transporteur HMA4 au niveau du parenchyme, FRD3 serait impliqué dans l'efflux de citrate et les protéines YSL transporteraient les complexes Zn-nicotianamine. (III) Dans les feuilles le Zn est déchargé par les protéines YSL et FRD3. (IV) Le Zn pourrait être chélaté par l'histidine et la nicotianamine. (V) Le Zn est stocké dans les vacuoles des cellules du mésophylle (*A. halleri*) ou des cellules de l'épiderme (*N. caerulescens*) via les transporteurs MTP1, HMA3 et MHX. Dans la vacuole, le Zn forme des complexes Zn-malate (d'après Verbruggen *et al.*, 2009).

L'identification de plantes hyperaccumulatrices de Zn, proches de la plante modèle *Arabidopsis*, a permis de progresser rapidement et d'accéder à de nouveaux outils (Verbruggen *et al.*, 2009). Cette proximité génomique est particulièrement élevée pour *Arabidopsis halleri* qui présente 94 % de similitude avec *Arabidopsis thaliana* au niveau des séquences codantes (Roosens *et al.*, 2008). Plusieurs études transcriptomiques ont permis de mettre en évidence l'implication d'un certain nombre de gènes dans les mécanismes de tolérance et d'accumulation aux ETMs (Becher *et al.*, 2004, Weber *et al.* 2006). Des études identiques ont été engagées sur une autre espèce hyperaccumulatrice de Cd, Ni et Zn, *Noccaea caerulescens* qui montre 88,5 % de similitude avec *Arabidopsis thaliana* au niveau des séquences codantes (Rigola *et al.*, 2006). Le postulat sur lequel repose ces études est que les gènes impliqués dans la tolérance et l'accumulation des ETMs ne sont pas des gènes spécifiques mais des gènes qui sont exprimés de façon ubiquitaire en conditions « normales » et qui sont régulés en présence d'un excès d'ETMs (Verbruggen *et al.*, 2009).

Par contre, les mécanismes moléculaires de la tolérance au Pb sont assez peu décrits, en particulier parce que le nombre de plantes décrites comme hyperaccumulatrices de Pb est restreint. Selon Bhargava *et al.* (2012), seules 14 espèces auraient été identifiées comme hyperaccumulatrices de Pb et, parmi celles-ci, *Sesbania drummondii*, *Arabis paniculata* et *Plantago orbignyana*.

Dans ce paragraphe, je vais m'attacher à faire l'état des connaissances concernant les mécanismes moléculaires de la tolérance aux ETMs et je préciserai, lorsqu'ils sont connus, les mécanismes spécifiques au Pb.

Les principales composantes de la tolérance des ETMs sont :

- le transport comprenant l'absorption, l'exclusion ou la translocation vers les zones de stockage,
- la chélation,
- la séquestration.

Le bon fonctionnement de ces 3 mécanismes permet une tolérance basique ; la perte d'un de ces 3 processus entraîne une sensibilité aux ETMs. Pour exemple, chez *Arabidopsis*, le mutant d'insertion *acbpl*, pour un gène qui code une protéine de liaison de l'Acyl-CoA (ACBP1), est plus sensible au plomb que l'écotype sauvage (Xiao *et al.*, 2008).

6-1) Transport

Le transport du Pb dans la plante peut se faire par deux voies : la voie apoplastique et la voie symplastique (fig. 9). La voie apoplastique correspond à un transport passif du Pb qui suit les mouvements de l'eau dans les espaces intercellulaires. Ce mode de transport va être fortement inhibé par l'endoderme, et principalement par les cadres de Caspari, qui jouent le rôle de barrière (Seregin & Ivanov, 1997; Verma & Dubey, 2003). L'autre voie est la voie symplastique où le Pb passe de cellule en cellule via le continuum intracellulaire formé par les plasmodesmes. Les mécanismes moléculaires responsables de l'entrée du Pb dans les cellules du rhizoderme ne sont toujours pas élucidés.

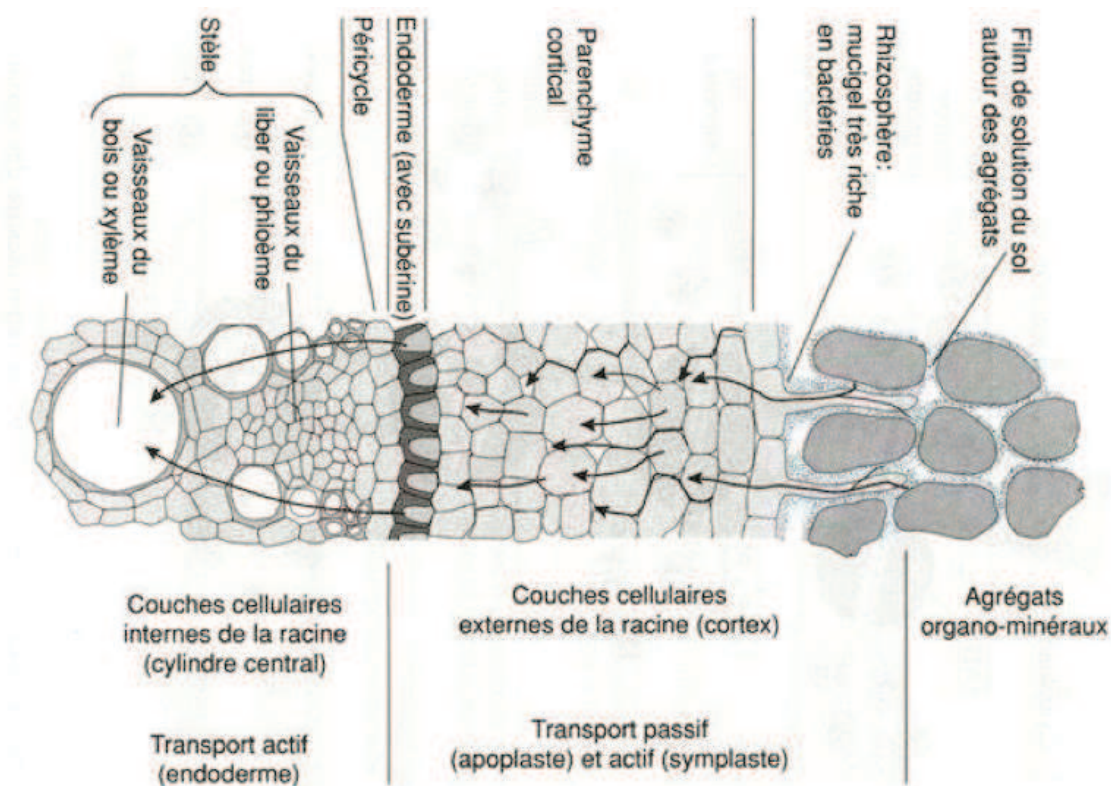


Figure 9 : Transport des ETMs à travers la racine. Schéma d'une coupe transversale de racine indiquant le transport apoplastique et symplastique des ions (d'après Gobat *et al.*, 1998).

6-1-1) Absorption

Il semblerait que le Pb puisse entrer dans la cellule par l'intermédiaire des canaux ioniques et/ou des transporteurs ioniques. Le Pb profiterait de la non-spécificité de certains de ces canaux/transporteurs et de la très forte différence de potentiel membranaire pouvant dépasser -200 mV dans les cellules du rhizoderme pour diffuser à l'intérieur de la racine.

Plusieurs transporteurs membranaires, impliqués dans l'entrée des ETMs dans les cellules de l'épiderme de la racine, ont été mis en évidence. Une des familles de gènes les plus importantes dans l'entrée des ETMs dans la cellule est la famille des transporteurs régulés par le Zn et des transporteurs régulés par le fer (Zinc and Iron regulated transporters Protein : ZIP). Chez *A. thaliana*, il y a douze gènes codant pour des transporteurs de zinc (ZIP) et trois pour des transporteurs de fer (IRT) (Chaffai & Koyama, 2011). Ces gènes sont, bien sûr, impliqués dans le transport des cations Fe^{2+} et Zn^{2+} mais il a également été montré que leur expression n'est augmentée que lors d'une déficience en Zn et en Fe chez les plantes sensibles alors qu'ils sont, en général, fortement exprimés chez les plantes hyperaccumulatrices en conditions normales (Kramer *et al.*, 2007). Les gènes orthologues de *IRT3*, *ZIP3*, *ZIP6*, *ZIP9* et *ZIP12* pourraient être impliqués dans l'absorption du Zn/Cd chez la plante hyperaccumulatrice *A. halleri* (Becher *et al.*, 2004, Weber *et al.*, 2004). Lombi *et al.* (2002) a montré qu'en présence d'une carence en fer, l'existence d'une corrélation entre l'augmentation de teneur endogène en Cd et la sur-régulation du transporteur IRT1 chez *N. caerulescens*.

L'inhibition de l'absorption racinaire du Pb par le calcium est un phénomène connu depuis longtemps (Garland & Wilkins, 1981). Dès 1996, Huang & Cunningham (1996) évoquaient le transport potentiel du Pb via des canaux calciques. De façon plus générale, l'ajout d'ions Ca^{2+} , Mg^{2+} ou K^{+} dans le milieu extérieur inhibe significativement la pénétration de Pb dans les racines de riz (Kim *et al.*, 2002). Chez le blé ou chez la fève, l'utilisation d'inhibiteurs de canaux calciques (lanthane) ou potassiques (chlorure de césium) a permis de montrer que ces canaux étaient, pour le Pb, des voies d'entrée dans la racine (Wang *et al.*, 2008 ; Pourrut *et al.*, 2008). Perfus-Barbeoch *et al.* (2002) a montré que les canaux calciques des cellules de garde d'*A. thaliana* étaient perméables au Cd. En effet, l'apport de Cd entraîne une fermeture stomatique et cette réponse est supprimée par l'application d'un inhibiteur des canaux calciques. Il a été montré également par White (2000) que les canaux calciques des cellules racinaires de blé étaient perméables au Cd. De plus, l'inhibition de l'entrée du Cd^{2+} par le Ca^{2+} est connue et expliquée par une compétition entre ces 2 cations au niveau des transporteurs membranaires (Clemens *et al.*, 2006).

Un autre transporteur transmembranaire, CNGC1 (cyclic nucleotide-gated ion channel) chez *Arabidopsis* et CBP4 (calmodulin-binding protein) chez le tabac, a été identifié comme intervenant dans l'assimilation du Pb chez *A. thaliana* et *N. tabaccum* (Sunkar *et al.*, 2000). Ces canaux sont proches de la famille des canaux ioniques mais seraient spécifiquement modulés par les nucléotides cycliques non sélectifs aux cations.

Une approche de génétique inverse a permis d'identifier, chez le tabac, un transporteur membranaire, LCT1 (Low Affinity Cation Transporter). Ce transporteur participerait à la régulation calcium-dépendante de la tolérance au Pb (Wojas *et al.*, 2007).

D'autres transporteurs transmembranaires, de la famille des CDF (Cation Diffusion Facilitator) et de la famille des NRAMPs (Natural resistance associated macrophage proteins), participent au transport du Cu, du Zn, du Cd ou du Mn (Hall & Williams, 2003 ; Colangelo & Guerinot, 2006, Sasaki *et al.*, 2012). Ces transporteurs pourraient également avoir un rôle dans le transport cellulaire du Pb, mais, à ce jour, aucune donnée n'est disponible.

6-1-2) Translocation

Le transport des ETMs vers les feuilles est la fonction principale qui différencie les plantes tolérantes dites « excluser » de celles qui sont accumulatrices. Toutefois, une grande partie du Pb absorbé au niveau de la racine va y rester (Huang & Cunnigham, 1996), ce qui n'est pas le cas pour tous les ETMs. Le Pb resterait sous forme liée dans l'espace apoplastique et seule une petite quantité serait transloquée. Le Pb doit passer des cellules du cortex aux cellules de l'endoderme et être déversé dans les faisceaux de xylème.

Une ATPase de Type P_{1B}, HMA4 (heavy metal ATPase), a été identifiée tout d'abord chez *A. thaliana* (Mills *et al.*, 2003) puis chez la plante hyperaccumulatrice *Noccaea caerulescens* (Papoyan & Kochian, 2004). Cette protéine membranaire serait impliquée dans le transport longue distance du Cd, du Pb, du Zn et du Cu (Wong & Cobbet, 2009, Verret *et al.*, 2004, 2005). Elle appartient à une famille multigénique qui compte 8 gènes chez *A. thaliana*. En fonction de leur séquence protéique, ces transporteurs sont soit des transporteurs de Zn/Cd/Co/Pb, soit des transporteurs de Cu/Ag (Williams & Mills, 2005). Il a été montré, par Hussain *et al.* (2004), que HMA2 serait impliqué dans le transport et l'homéostasie du Zn et aurait un rôle redondant à celui de HMA4.

Grâce aux études transcriptomiques hétérologues, un transporteur appartenant à la famille des MATE (Multidrug and toxin efflux family), FRD3 (Ferric Reductase Defective), a été identifié comme pouvant être impliqué dans la translocation du Zn chez *A. halleri* (Talke *et al.*, 2006) et *N. caerulescens* (Van de Mortel *et al.*, 2006).

Un transporteur membranaire NRAMP5 serait impliqué dans la translocation du Cd de la racine vers la feuille chez le riz (Sasaki *et al.*, 2012).

6-1-3) Exclusion

L'exclusion des ETMs en tant que mécanisme de la tolérance aux métaux a été souvent sous-estimée alors que la plupart des plantes tolérantes sont des « excluders » (Verbruggen *et al.*, 2009). Ainsi, un transporteur membranaire de type ABC (ATP Binding Cassette) chez *Arabidopsis*, PDR12 (Pleitropic drug resistance) est impliqué dans l'exclusion du Pb (Lee *et al.*, 2005). C'est le premier transporteur impliqué dans l'exclusion du Pb caractérisé chez les plantes. Auparavant, des transporteurs bactériens (Znt1) et de levures (CAD2) ont été identifiés respectivement par Sharma *et al.* (2000) et Shiraishi *et al.* (2000). Ces transporteurs membranaires sont des ATPases de type P qui transportent le Zn, le Cd et le Pb vers l'extérieur de la cellule. Depuis, un autre transporteur de la même famille ABC, PDR8, a été clairement caractérisé comme transporteur d'efflux de Cd chez *Arabidopsis* mais son implication dans le transport du Pb reste à vérifier même si elle semble probable (Kim *et al.*, 2007).

6-2) Chélation

La chélation des ETMs dans le cytoplasme par des ligands, avant la compartimentation du complexe ligand-ETM, est le mécanisme retenu (pour revue Haydon & Cobbett, 2007).

La chélation des ETMs dans la cellule nécessite des ligands à forte affinité que sont le glutathion, les phytochélatines, les métallothionéines, les défensines, les acides organiques et certains acides aminés.

6-2-1) Glutathion

Le glutathion (GSH) est un tri-peptide dont la formule est γ -glutamyl-cysteinyl-glycine. Il est synthétisé dans le cytosol et les chloroplastes à partir de molécules de cystéine et de glutamate grâce à deux enzymes : l' γ -glutamylcystéine synthétase (γ -EC synthase) et la glutathion synthétase (GSH synthase, fig.10). Le GSH peut former des complexes avec les ions métalliques comme le Pb ou le Cd (Reddy, 2005). Cette réaction de conjugaison se fait grâce à une enzyme, la glutathion-S-transférase (GST) (Chasseaud, 1979; Peuke & Rennenberg, 2005). Le nombre de molécules de GSH nécessaire pour fixer un ion Pb^{2+} n'est pas connu. En présence de Pb, l'activité de la GST est stimulée chez *Macrotyloma uniflorum* et *Cicer arietinum* (Reddy *et al.*, 2005) et la teneur en GSH doublée chez *Sesbania drummondii* (Ruley *et al.*, 2006). Le GSH est également impliqué dans la détoxification des

ETMs en intervenant dans le traitement contre les espèces réactives à l'oxygène (pour revue Yadav, 2010). Il rentre dans la voie de biosynthèse des phytochélatines puisque c'est le substrat de la phytochélatine synthase (fig.10).

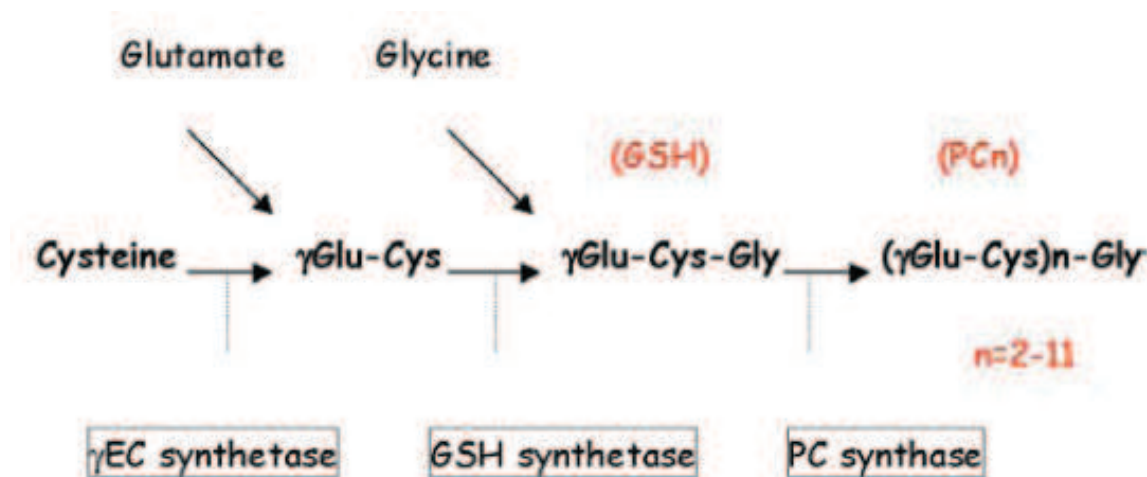


Figure 10 : Voie de biosynthèse des phytochélatines. γEC : γ-glutamyl cystéine, GSH : Glutathion, PC : Phytochélatine (d'après Inouhe, 2005).

6-2-2) Phytochélatines (PCs)

Les PCs sont composés de 3 acides aminés : Glu, Cys et Gly et leur formule générale est $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ où n est compris en général entre 2 et 11 (Rauser, 1995). Elles possèdent en C-terminal un acide aminé variable tel que la glycine, l'γ-alanine, la serine ou l'acide glutamique et sont classées en fonction de cet acide aminé terminal (Cobbett & Goldsbrough, 2002). Ces molécules riches en cystéine sont synthétisées par la phytochélatine synthase (PC synthase) à partir du glutathion (fig. 10). La synthèse des PCs est induite par de nombreux métaux dont le Pb (Piechalak *et al.*, 2002). Une induction de la PC synthase concomitant à une augmentation des PCs a été démontrée chez la plante aquatique *Salvinia minima* lorsque celle-ci est exposée au Pb (Estrella-Gomez *et al.*, 2009). Les PCs interagissent avec les ETMs à travers le groupement thiol (-SH) de la cystéine (Pal, 2010). Le modèle le plus documenté concerne le Cd (Cobbett & Goldsbrough, 2002). Ainsi, le Cd forme un complexe PC-Cd qui est transporté dans la vacuole pour y être séquestré via un transporteur membranaire de type ATP-Binding Cassette (ABC). Si le rôle des PCs, dans la détoxification des ETMs, est acquis chez les plantes tolérantes, les PCs ne semblent pas, par contre, être impliquées dans ce mécanisme chez les plantes hyperaccumulatrices (Inouhe, 2005). Par exemple, Ebbs *et al.* (2002) a montré que les PCs n'étaient pas impliquées dans la tolérance au Cd chez la plante

hyperaccumulatrice *N. caerulescens*. Un traitement à la buthionine-sulfoximine, inhibiteur de la biosynthèse de la PC, affecte la tolérance au Cd chez les plantes non métallicoles mais pas chez *N. caerulescens* (Schat *et al.*, 2002).

6-2-3) Métallothionéines (MTs)

Les MTs sont des protéines de faible poids moléculaire (4-8 kDa) riches en cystéine. Elles ont une forte affinité pour les ETMs grâce à leur motif –SH. Selon l'arrangement de leurs résidus cystéines, les MTs sont classées en 4 catégories chez les plantes (Cobbett & Goldsbrough, 2002 ; Roosens *et al.*, 2005). Selon leur composition en résidus Cys et His et leur répartition le long de la protéine, les MTs vont pouvoir fixer les ETMs (fig. 11). Les MTs sont codées par de petites familles de gènes. Par exemple, la plante modèle *Arabidopsis* en compte 8. Chez les mammifères et les champignons, les MTs sont identifiées comme des chélateurs de Cd et de Zn (Clemens, 2001). Leur rôle n'est pas aussi bien connu chez les plantes où elles seraient impliquées dans l'homéostasie du Zn chez le maïs, le blé et *Arabidopsis* (Rauser, 1999). Plusieurs études ont montré l'implication des MTs dans la tolérance au Cd. Ainsi, la surexpression d'*AtMT2a* et *AtMT3* chez *Vicia faba* augmente la tolérance au Cd (Lee *et al.*, 2004). L'expression de *BjMT2* chez *A. thaliana* augmente la tolérance au Cd et au Cu de ces plantes (Zhigang *et al.*, 2006) et l'expression combinée de *AtHMA4* et *AtMT2b* chez *N. tabaccum* augmente sa tolérance au Cd (Grispen *et al.*, 2010). Huang & Wang (2009) ont montré que le Pb induisait l'expression du gène codant la MT2 chez *Bruguiera gymnorhiza* et de 6 gènes codant les MTs chez *Oriza sativa* (Xu *et al.*, 2007). Les MTs seraient également impliquées dans le nettoyage et l'épuration (scavenging) des ROS (Reactive Oxygen Species). En effet, les résidus Cys qui fixent les ETMs fixeraient également les ROS (Hassinen *et al.*, 2011).

6-2-4) Défensines

Des travaux récents ont montré le rôle des défensines dans la tolérance au Zn chez *A. halleri* (Mirouze *et al.*, 2006). Elles étaient connues jusqu'alors que pour leur rôle antifongique. Lorsque cette protéine est exprimée dans la levure, elle lui confère la tolérance au Zn mais pas au Cd. De même, lorsqu'elle est surexprimée chez *Arabidopsis*, elle augmente la tolérance des plantes transformées par rapport aux plantes sauvages. Ces petites protéines, riches en cystéine (8 résidus), pourraient chélater le Zn.

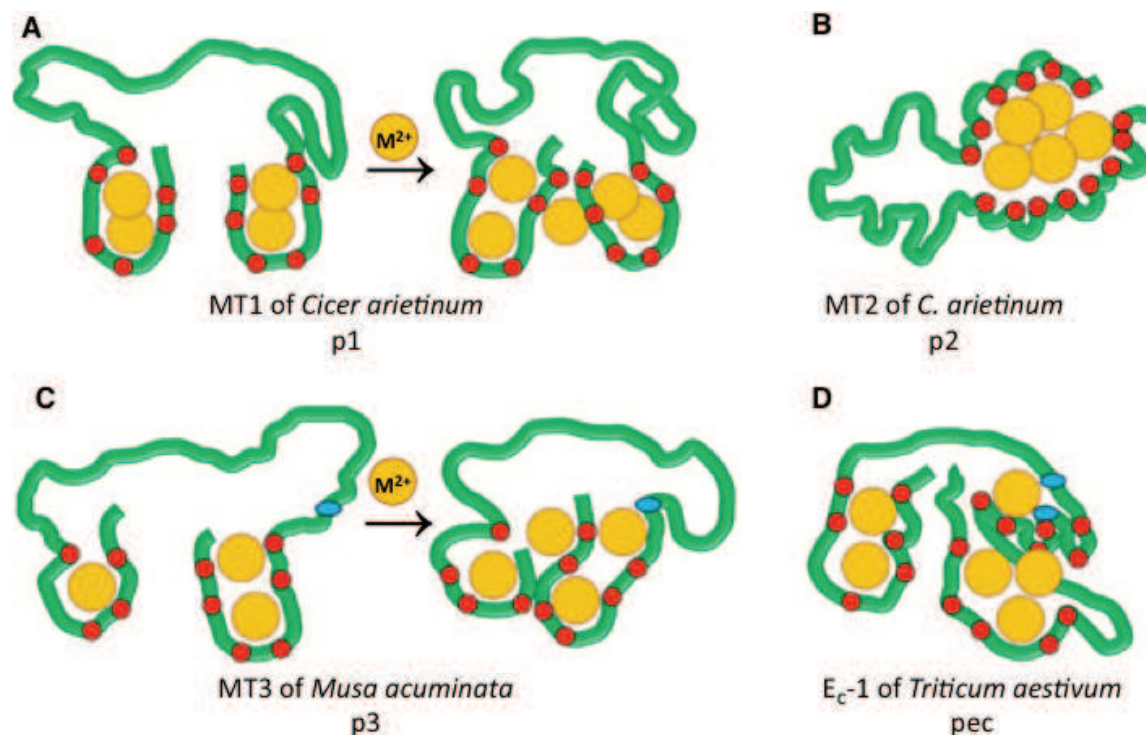


Figure 11 : Proposition de modèles représentant les différentes familles de Métallothionéines. En vert : chaîne polypeptidique, rond rouge : cystéine, ovale bleu : histidine, jaune : ETM (d'après Hassinen *et al.*, 2011).

6-2-5) Acides organiques et les acides aminés

De par la forte réactivité des ions métalliques avec S, N, et O, les acides organiques et les acides aminés sont des ligands potentiels pour les ETMs dans la cellule (Clemens, 2001). Ils sont impliqués dans le transport des ETMs à travers le xylème et dans la séquestration vacuolaire (Rauser, 1999). L'acide citrique a une forte affinité pour les ETMs et, en particulier, pour le Fe, le Ni et le Cd. D'autres acides organiques, tels que l'acide malique et l'acide oxaloacétique, chélatent également les ETMs (Briat & Lebrun, 1999).

La nicotianamine (NA) est un chélateur des ions métalliques divalents (Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} et Cu^{2+}) mais elle peut aussi chélater le Fe^{3+} (Schuler & Bauer, 2011). La NA résulte de la condensation de 3 molécules de S-adénosyl méthionine réalisée par la nicotianamine synthase (NAS).

La NA forme des complexes avec les ETMs et participe à leur circulation dans les sèves xylémiennes et phloémiennes. Chez *N. caerulea*, bien que le gène de la NAS ne soit exprimé que dans les feuilles, l'exposition de la plante au nickel provoque une accumulation de NA dans la racine (Mari *et al.*, 2006). De plus, un complexe Ni-NA a été mis en évidence dans le xylème de *N. caerulea* (Ouerdane *et al.*, 2006). Ceci suggère que le Ni, en excès dans la racine, est complexé à la NA pour être acheminé via le xylème vers les parties

aériennes, où il y sera stocké. La NAS est induite par le Zn chez *N. caerulescens* (Van de Mortel *et al.*, 2006) et *A. halleri* (Talke *et al.*, 2006).

6-3) Séquestration ou compartimentation

Une fois que les ETMs ont formé un complexe avec les différents chélateurs présentés ci-dessus, les complexes formés sont généralement séquestrés dans les vacuoles, au niveau des feuilles et, dans une moindre mesure, au niveau des racines.

De nombreux transporteurs situés au niveau du tonoplaste ont été identifiés. Ils appartiennent principalement à 2 catégories : Les ATPases de type P et les transporteurs de type ABC.

Le gène *HMA3* (heavy metal ATPase), qui code pour une ATPase de type P, complémente des mutants de levure hypersensibles au Pb et au Cd. De plus, ce transporteur serait localisé au niveau du tonoplaste (Gravot, 2004). Quant aux transporteurs de type ABC, on peut noter que l'activité du promoteur du gène qui code pour la protéine MRP3 (Multidrug Resistance-Associated) est augmentée par le Pb (Zientara *et al.*, 2009). Chez Arabidopsis, un transporteur mitochondrial de type ABC, ATM3, serait impliqué dans la tolérance au Cd et au Pb et dans l'accumulation du Cd dans les feuilles (Kim *et al.*, 2006). Cette résistance au Cd et au Pb serait dépendante du glutathion et ATM3 transporterait les conjugués GS-ETM à travers la membrane mitochondriale.

La famille des « Natural Resistance-Associated Macrophage Protein » (NRAMP) transporte les cations vers le cytoplasme et leur première fonction biologique est l'homéostasie du Fe (Krämer *et al.*, 2007). Ces transporteurs pourraient jouer en plus, un rôle dans l'accumulation des ETMs. En effet, NRAMP3 serait impliqué dans la remobilisation du Fe, du Mn, du Zn et du Cd (Thomine *et al.*, 2003).

7) Objectifs de la thèse

L'exploitation minière a été l'une des activités économiques les plus exercées par la population marocaine au cours des siècles. Les sols marocains sont riches en minerais métallifères comme le Fe, le Cu, le Zn, l'Ag et le Pb (Boularbah *et al.*, 2006) et, en 2010, le Maroc produisait encore 44,7 Kt de Fe, 53,3 Kt de Cu, 46,4 Kt de Pb, 87,4 Kt de Zn, 75,6 Kt de Mn et 31,1 Kt de Co (Source Ministère de l'Énergie, des Mines, de l'Eau et de l'Environnement du Royaume du Maroc, 2011). La production de métaux a connu un essor au début XX^{ème} siècle, en particulier dans l'est du Maroc avec l'exploitation des mines du district

de Mibladen/Zeïda et de Touissit/Boubker. L'extraction de minerai de Pb représente une part importante de cette activité minière. Le pic d'exploitation du Pb a eu lieu dans les années 1980 où la production marocaine représentait jusqu'à 3,5 % de la production mondiale (Wadjini, 1998). En 2005, La production du Pb au Maroc ne représente plus que 1,4% de la production mondiale (Source Ministère de l'Énergie, des Mines, de l'Eau et de l'Environnement du Royaume du Maroc, 2011). La plupart des filons de l'est du Maroc ont été épuisés vers la fin des années 80.

Le code minier marocain, en cours durant la période d'exploitation de ces mines, ne prévoyait pas de close particulière concernant la protection de l'environnement (El Hachimi *et al.*, 2007). C'est seulement en 2005 qu'un projet de loi sur les mines prévoit l'introduction de mesures pour la protection de l'environnement (Source Ministère de l'Énergie, des Mines, de l'Eau et de l'Environnement du Royaume du Maroc). De nombreux sites miniers, lors de l'arrêt de leur exploitation, ont été laissés à l'abandon sans aucune réhabilitation, ni protection. Certaines des digues de résidus ont été recouvertes de stérile minier. De rares essais de revégétalisation ont été menés mais malheureusement souvent avec des plantes qui n'étaient pas adaptées aux conditions climatiques semi-arides de la région. De nombreuses digues nues sont en proie à l'érosion par des vents violents dans ces régions et par la pluie dont les épisodes sont rares mais violents entraînant des ruissellements.

Ce travail de thèse s'inscrit dans un projet de recherche impulsé par les partenaires marocains (CNESTEN) portant sur la phytoremédiation des sols pollués par des plantes tolérantes originaires de la région polluée. Deux axes de recherche ont orienté ce travail :

7-1) Identifier et caractériser une plante endémique au Maroc, tolérante au Pb

Une étude préliminaire a porté sur la caractérisation du site d'étude qui comprend les mines abandonnées de Touissit et de Boubker ainsi que la fonderie en activité de Oued el Himer. (Smouni *et al.*, 2010). Des prélèvements de sols ont été réalisés au niveau de ces sites. Des mesures du pH et de la concentration en ETM (As, Cd, Cu, Ni, Zn et Pb) ont été menées sur ces échantillons.

L'objectif était d'identifier des plantes locales, tolérantes au Pb et adaptée aux conditions climatiques, qui puissent être intégrées dans un programme de phytoremédiation. C'est pour cela qu'un inventaire floristique a été engagé en se focalisant, dans un premier temps, sur les plantes prépondérantes de ces zones à forte pollution polymétallique (Smouni *et al.*, communication personnelle). Deux plantes ont attiré notre attention de par leur forte teneur en Pb dans les parties aériennes :

- *Cistus libanotis* pour laquelle un brevet sur son utilisation en phytoremédiation a été récemment déposé par l'équipe (n°09 305 421 intitulé : « Use of *Cistus Libanotis* to clean heavy metals containing soil »).

- *Hirschfeldia incana*, une *brassicaceae* méditerranéenne qui a fait l'objet de ce travail de thèse

Dans un premier temps, l'accumulation du Pb dans les parties aériennes et les racines d'*H. incana* en conditions contrôlées a été confirmée. La caractérisation de la réponse moléculaire de la tolérance au Pb a été menée en utilisant *H. incana* comme plante d'étude. En s'appuyant sur les données de la littérature, une stratégie « gène candidat » a été engagée. L'expression de 7 gènes pouvant intervenir dans le transport et la chélation du Pb a été mesurée chez *H. incana* et la plante modèle sensible *A. thaliana*. L'expression de ces 7 gènes a été mesurée dans les feuilles et les racines des plantes exposées ou pas au Pb. Deux gènes, un codant une métallothionéine MT2a et l'autre codant un transporteur membranaire HMA4, ont été identifiés comme pouvant être impliqués dans la tolérance et l'accumulation du Pb (Auguy *et al.*, soumis). Cette étude a montré qu'*H. incana* pourrait être une espèce végétale particulièrement performante pour l'étude des mécanismes moléculaires de la tolérance au Pb chez les plantes.

7-2) Identifier des gènes impliqués dans la tolérance du Pb

Dans un second temps, une approche transcriptomique, en condition hétérologue, a été réalisée pour identifier des gènes impliqués dans les mécanismes moléculaires de la tolérance au Pb chez *H. incana*. Une étude préliminaire a montré qu'*H. incana* est génétiquement proche d'*A. thaliana* aussi bien dans les séquences des régions codantes que non codantes (Auguy *et al.*, soumis). Des ADNc d'*H. incana* traités ou pas avec du Pb ont été hybridés avec des puces à ADN d'*A. thaliana*. En parallèle, des ADNc d'*A. thaliana* traités ou pas avec du Pb ont été hybridés avec les mêmes puces. La comparaison de l'expression des gènes d'*H. incana* et d'*A. thaliana* nous a permis d'identifier des gènes candidats, susceptibles d'être impliqués dans les mécanismes de la tolérance au Pb. Une analyse fonctionnelle de quatre de ces gènes a été menée grâce aux mutants d'insertion existants chez *A. thaliana*, pour connaître leur fonction dans la tolérance au Pb.

Chapitre 2

Description du site d'étude

1) Contexte marocain

Sans parler du phosphate, le Maroc a eu et a encore une activité minière importante et il est connu pour ses nombreux sites miniers notamment de Pb et de Zn (régions d'Oujda, de Figuig et d'Er Rachidia). Suite à l'épuisement des filons, ces sites miniers ont progressivement été abandonnés dans les années 1980. Leur exploitation, durant plusieurs décennies, a entraîné l'accumulation de milliers de tonnes de résidus pour la plupart abandonnés à l'air libre. Ces résidus, riches en ETMs toxiques, sont à l'origine de problèmes environnementaux et sanitaires. De plus, en raison d'un couvert végétal épars et peu abondant et d'une érosion très active dans ces régions semi-arides à arides, les contaminations par les ETMs sont disséminées par le vent et par le ruissellement des eaux de surface vers les régions habitées avoisinantes.

A cette époque-là, aucune loi n'imposait aux industriels une réhabilitation des sites après leur fermeture. Cependant, depuis quelques années, une prise de conscience nationale a eu lieu sur la nécessité de protéger l'environnement et elle a abouti, en mars 2010, à la publication d'une Charte de l'Environnement et du Développement Durable. Dans ce contexte, le Centre National de l'Energie, des Sciences et des Techniques Nucléaires (CNESTEN) a créé, en 2007, un laboratoire de biologie des plantes dont la thématique principale est l'étude des sites pollués et leur réhabilitation par la phytoremédiation.

Les chercheurs marocains, impliqués dans ce projet, ont choisi, comme site d'étude, une zone géographique qui se trouve au sud de la ville d'Oujda à la frontière de l'Algérie. Ce site particulièrement intéressant combine la présence de deux mines de Pb/Zn abandonnées (la mine de Boubker et la mine de Touissit), de nombreuses digues de stockage de résidus miniers et d'une fonderie encore en activité (la fonderie de Oued el Himer). L'ensemble de ces activités minières se situe à proximité de deux villages, Touissit et Boubker, représentant une population de près de 4000 habitants. On notera, dans cette zone, la présence de nombreux puits pour l'alimentation animale mais aussi humaine et d'un cours d'eau traversant la zone de dépôt des scories de la fonderie de Oued el Himer. De plus, suite à la fermeture des mines, les familles des anciens mineurs qui n'ont pas fui cette région économiquement sinistrée, se sont reconverties dans l'agriculture (oliveraies, vergers, céréales et potagers) et dans l'élevage (moutons et chèvres) dans des secteurs agricoles fortement impactés par une pollution polymétallique.

La première étude a consisté à faire l'état des lieux de la pollution par les ETMs dans les différents types de sols de cette zone (sol végétalisé, scories de la fonderie, « sable » des digues de résidus de traitement et sol « stérile » recouvrant les digues). Ce travail est présenté dans l'article suivant :

Smouni A., Ater M., **Auguy F.**, Laplace L., Mzibri M., Berhada F., Filali-Maltouf A. et Dumas P. (2010). Évaluation de la contamination par les éléments-traces métalliques dans une zone minière du Maroc oriental. Cahiers Agricultures, 19, 1-7.

2) Présentation du site d'étude et analyse des sols

Étude originale

Évaluation de la contamination par les éléments-traces métalliques dans une zone minière du Maroc oriental*

Abdelaziz Smouni¹
Mohammed Ater²
Florence Auguy³
Laurent Laplace³
Mohammed El Mzibri¹
Fatiha Berhada⁴
Abdelkarim Filali-Maltouf⁴
Patrick Doumas³

¹ CNESTEN
Centre national de l'énergie,
des sciences et des techniques nucléaires
Laboratoire de biotechnologie des plantes
UBRM-DSV
BP 1382 R.P.
10001 Rabat
Maroc
<azizsmouni@yahoo.com>
<mzibri@yahoo.com>

² Faculté des sciences
Université Abdelmalek Essaâdi
Laboratoire « Diversité et conservation
des systèmes biologiques »
BP 2062
93002 Tétouan
Maroc
<mohammed.ater@gmail.com>

³ IRD
Institut de recherche pour le développement
Équipe Rhizogenèse (INRA/IRD/UM2)
UMR DIAPC
911, Av. Agropolis
34394 Montpellier cedex 5
France
<patrick.doumas@ird.fr>
<laurent.laplace@ird.fr>
<florence.auguy@ird.fr>

⁴ Faculté des sciences
Université Mohammed V - Agdal
Laboratoire de microbiologie et biologie
moléculaire
Av. Ibn Batouta
BP 1014
10001 Rabat
Maroc
<filalimaltouf@gmail.com>
<fatibrhada@hotmail.com>

Résumé

La contamination des sols et des résidus miniers dans la région orientale du Maroc a été évaluée par dosage des éléments-traces métalliques (ETM) (As, Cd, Cu, Ni, Pb et Zn) par ICP-AES (*inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry*). Ce travail révèle une contamination importante des sites étudiés et souligne une grande variabilité dans les concentrations en ETM en fonction de l'élément analysé et du site étudié. L'index de pollution des stations étudiées est généralement très élevé du fait de la présence simultanée de plusieurs de ces éléments. Cette combinaison de différents ETM rend les sols de la région toxiques pour la flore, la faune et les populations locales. Une analyse des espèces végétales qui se développent sur ces zones polluées est envisagée dans le cadre de la mise en place d'un programme de phytoremédiation.

Mots clés : élément métallique ; Maroc ; oligo-élément ; pollution du sol ; résidu.

Thèmes : pathologie ; ressources naturelles et environnement ; sols.

Abstract

Assessment of contamination by metallic trace elements in a mining area of eastern Morocco

Soil and tailings contamination in the eastern region of Morocco was investigated by determining metallic trace elements (MTE) (As, Cd, Cu, Ni, Pb and Zn) using inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (ICP-AES). This work revealed extensive contamination of the sites studied and also showed a great variability in the concentrations of MTE according to the element analyzed and the site. The soil index pollution is considered very high because of the simultaneous presence of these elements. This combination of MTE in soils makes the region toxic to flora, fauna and local populations. An exploration of plant species growing on these contaminated areas will be considered in the context of the implementation of a program for phytoremediation.

Key words: metallic elements; Morocco; residues; soil pollution; trace elements.

Subjects: natural resources and environment; pathology; soils.

L e développement mondial de l'industrialisation a entraîné une utilisation massive de plusieurs types de minerais métallifères et une croissance importante des activités minières. Ces activités minières sont fortement polluantes et leurs impacts sur l'environnement et la santé sont à l'échelle de leur importance économique (Jung, 2001 ; Navarro *et al.*, 2008).

La plupart des polluants miniers sont nocifs pour la faune et la flore des milieux terrestres et aquatiques. En plus des lixiviats acides et des résidus miniers qui provoquent une détérioration des écosystèmes, les éléments-traces métalliques (ETM) sont à l'origine d'effets encore plus néfastes sur les fonctions physiologiques des organismes vivants (Boularbah *et al.*, 2006 ; Lim *et al.*, 2007). À faibles

* Pour citer cet article : Smouni A, Ater M, Auguy F, Laplace L, El Mzibri M, Berhada F, Filali-Maltouf A, Doumas P. Évaluation de la contamination par les éléments-traces métalliques dans une zone minière du Maroc oriental. *Cah Agric* 2010 ; 19 : 1-7. DOI : 10.1684/agr.2010.0413

Tirés à part : P. Doumas

doses, des métaux comme le fer, le zinc, le chrome et le cuivre sont nécessaires à la vie. Cependant, à fortes doses, ils sont toxiques et peuvent être à l'origine de complications fonctionnelles importantes et de troubles de santé graves. Par ailleurs, certains métaux comme le plomb, le mercure ou l'arsenic sont très toxiques et sont classés parmi les polluants dits « polluants atmosphériques dangereux » (Lee et Chon, 2003).

Plusieurs études se sont intéressées à la pollution par les ETM des sites miniers et de leurs alentours et à l'impact de ces activités sur l'environnement (Rybicka, 1995 ; Lee *et al.*, 2001). Ces études ont montré que la pollution par les ETM peut affecter l'écosystème de manière irréversible si des mesures adéquates de protection ne sont pas prises rapidement. En raison des phénomènes d'érosion dans les zones contaminées, les ETM peuvent se retrouver dispersés dans les réseaux fluviaux ou sous forme d'aérosols à plusieurs kilomètres des sites d'origine. Cette contamination diffuse rend le phénomène encore plus dévastateur et difficile à contrôler (Bell *et al.*, 2001 ; Schwartz *et al.*, 2001 ; Passariello *et al.*, 2002).

L'activité minière est l'un des piliers fondamentaux de l'économie marocaine, et le secteur des métaux a connu un développement substantiel depuis 1919. La production marocaine de plomb avait dépassé 170 000 tonnes en 1980, représentant 3,5 % de la production mondiale (Wajdini, 1998). Dans ce contexte, les mines du Maroc oriental ont largement contribué à la production nationale de plomb. Cependant, les activités minières ont conduit à une modification profonde du paysage de la région et à sa contamination par les sous-produits des traitements et les déchets rejetés.

L'objectif de ce travail est de réaliser une évaluation préliminaire du taux de pollution des sols par les éléments-traces métalliques au niveau de l'un des principaux sites miniers du Maroc oriental : le district minier de Boubker et Touissit ainsi que la fonderie d'Oued El Heimer.

Matériel et méthode

Description des sites

La région d'étude se situe au niveau de la chaîne des horsts, bande montagneuse qui s'étend sur une longueur de 100 km

et une largeur de 20-30 km. Cette chaîne est limitée au nord par le couloir Oujda-Taourirt, à l'ouest par la plaine de Tafraça, au sud par le vaste domaine des hauts plateaux et à l'est par la frontière maroco-algérienne. Le site d'étude se situe dans la partie orientale de cette chaîne montagneuse, au niveau de la fonderie d'Oued El Heimer et des mines Touissit et Boubker (figure 1).

La fonderie d'Oued El Heimer, à proximité du village du même nom, se trouve à 33 km au sud-est de la ville d'Oujda. Cette fonderie encore en activité est spécialisée dans le traitement, la fusion et le raffinage du plomb et de l'argent. Depuis 1945, l'unité traite les minerais provenant de l'ensemble des districts miniers du Maroc oriental. À partir de 1980, suite à l'épuisement des sites marocains, la matière première est principalement importée du Mexique, du Brésil, de la Tunisie et de l'Algérie. Cette région est soumise à une forte pollution aérienne due à l'émission de gaz chargés de poussières fines qui polluent les zones avoisinantes, en particulier les zones situées dans la direction des vents dominants (N-NE). Des tentatives de reboisement de la zone avoisinant la fonderie ont été entreprises mais, en raison des fortes émissions de gaz, le massif forestier situé dans l'axe des vents dominants n'a pu résister à cette pollution (figure 2A, stations OH1 à OH7). Seuls persistent quelques arbres situés de part et d'autre de cette zone. Les sols sont également soumis à une forte pollution par une accumulation massive de scories au voisinage direct de la fonderie (figure 2B, stations OH8 à OH11). Ces scories sont disposées au bord d'un cours d'eau qui, en période de crues, en emporte

une quantité importante sous forme particulaire ou dissoute. Ce lessivage peut constituer une source majeure de contamination des sols et des points d'eau avoisinants.

Les sites de Boubker et de Touissit, situés à une trentaine de kilomètres au sud de la ville d'Oujda, ont respectivement été fermés en 1975 et 2002, suite à l'épuisement des réserves, après une exploitation de près de 40 ans pour Boubker et de 75 ans pour Touissit. La source de pollution dans cette région est principalement constituée par les déchets de lavage formant des digues de sable de grande superficie. Ces sables sont facilement transportés par les vents et les précipitations sous forme particulaire. Il est important de souligner la présence de nombreuses habitations directement au pied des digues (figure 3A). Par ailleurs, certaines de ces digues ont été recouvertes par un substrat (stérile) correspondant aux matériaux résiduels directement issus du minerai extrait lors de l'exploitation de la mine. La station Toui1 correspond à la plus ancienne digue de la région de Touissit. Cette digue, recouverte depuis une dizaine d'années, a fait l'objet de reboisement par du pin. Les stations Toui2 et Toui3 sont situées respectivement sur une digue non recouverte et une digue recouverte ayant fait l'objet de reboisement par du pin et de l'acacia. La station Toui4 correspond à la digue la plus récente, en cours de recouvrement. La station Toui5 est située près de l'entrée du puits de la mine de Touissit. Les stations Toui6 et Toui7 sont situées respectivement dans les zones recouvertes et non recouvertes de la plus grande digue de Touissit. Cette digue porte un couvert épars de pin et d'acacia (figure 3B).

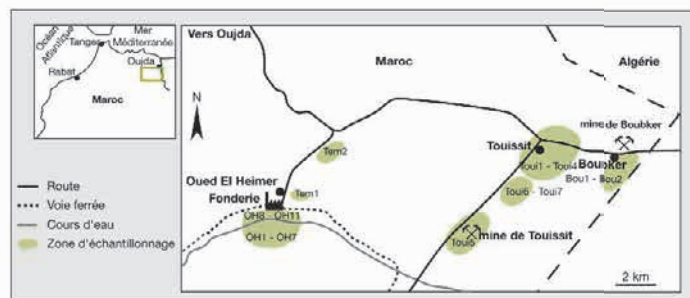


Figure 1. Situation géographique des régions étudiées et localisation des stations de prélèvements.

Figure 1. Geographic settings of the study sites and location of sampling stations.



Figure 2. Description du site d'Oued El Heimer.

Figure 2. Description of Oued El Heimer site.

A) vue d'ensemble de la fonderie et de la zone dénudée de végétation située dans le passage des émanations de gaz et de poussière émises par la cheminée ; B) scories plombifères déposées sur de grandes surfaces aux abords de la fonderie et du cours d'eau.

Les stations Bou1 et Bou2 sont situées au niveau d'une digue de sable restée nue et sans traitement, ni couverture végétale (figure 3C).

Deux sites témoins – Tem1 et Tem2 – à l'écart des activités minières, ont également été utilisés. Tem1 se situe au niveau du Jbel Magaze, à 1 km de la fonderie dans le sens opposé au vent dominant et Tem2 entre Touissit et Oued El Heimer. Les échantillons de sol ont été prélevés sur 22 stations dans les trois régions étudiées (tableau 1). Pour l'ensemble des échantillons, la partie superficielle du sol, d'une surface de 0,3 m², a été prélevée sur 10 cm de profondeur, homogénéisée et tamisée (< 2mm).

Mesure du pH

Dix grammes de sol sont mis en suspension dans 50 mL d'eau distillée. Le mélange est agité pendant 1 heure à

l'aide d'un agitateur magnétique et est ensuite décanté pendant 30 min. Le pH est déterminé sur le surnageant directement à l'aide d'un pH-mètre (Moreno *et al.*, 1996).

Dosage des métaux

Les échantillons de sols sont séchés à température ambiante puis broyés pour avoir une granulométrie inférieure à 180 µm. Le sol ainsi finement moulu est minéralisé selon la procédure suivante : à 100 mg de sol, sont ajoutés 2 mL de HNO₃ concentré. La solution est portée à sec à 110 °C puis 3 mL d'acide fluorhydrique concentré sont ajoutés et les extraits sont maintenus 15 heures à 140 °C. Après refroidissement à 110 °C, 2 mL de HNO₃ concentré sont ajoutés. Cette opération est répétée trois fois puis les extraits secs sont repris par 25 mL de HCl 2M avant d'être analysés. Les concentrations en As, Cd, Cu, Ni, Pb

et Zn sont ensuite déterminées par ICP-AES (inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry ; Ultima2 JY) selon la méthode de Marguí *et al.* (2005).

Résultats et discussion

Mesures du pH

Les résultats obtenus montrent des valeurs de pH neutre à faiblement acide, variant entre 5,5 et 7,8 (tableau 2). Parmi l'ensemble des prélèvements, seuls deux prélèvements présentent des pH légèrement acides dans le site d'Oued El Heimer. Des résultats similaires ont été rapportés par Pichtel *et al.* (2000) pour des sols avoisinant une fonderie de plomb aux États-Unis. Saïdi (2004) rapporte des valeurs de pH comprises entre 7,5 et 8,1 dans le district minier de Zaïda dans le Maroc oriental. Cependant, Navarro *et al.* (2008) ont trouvé des valeurs de pH comprises entre 3,1 et 8,4 dans les régions minières de Cabezo Rajao en Espagne. Plusieurs auteurs ont montré que le pH du sol joue un rôle majeur dans la solubilité et la biodisponibilité des métaux (Basta *et al.*, 1993 ; Jung et Thornton, 1996). Dans notre étude, de nombreux sites présentent des pH alcalins dont l'origine résulte généralement de la présence de carbonates dans le sol. Ces carbonates peuvent être un réservoir important pour les ETM du sol. Kabata-Pendias et Pendias (1992) rapportent que le Cd, le Cu, le Pb et le Zn ont une affinité particulièrement élevée pour les carbonates. Ainsi, dans les milieux où les concentrations en plomb sont relativement élevées, les carbonates sous forme d'hydrocérusite et de cérusite, sont les régulateurs majeurs de la distribution de cet élément dans les sols et les eaux superficielles (Essington *et al.*, 2004).

Mesure de la concentration en ETM dans les sols

Les concentrations en As, Cd, Cu, Ni, Pb et Zn dans les échantillons de sol prélevés dans les différentes stations sont présentées dans le tableau 2.

Les régions minières de Touissit et Boubker se caractérisent par des teneurs qui varient entre 11 et 187 ppm d'As, entre 0 et 57,5 ppm de Cd, entre 31 et 2 253 ppm de Cu, entre 3 et 12,3 ppm de Ni, entre 84 et 7 458 ppm de Pb et

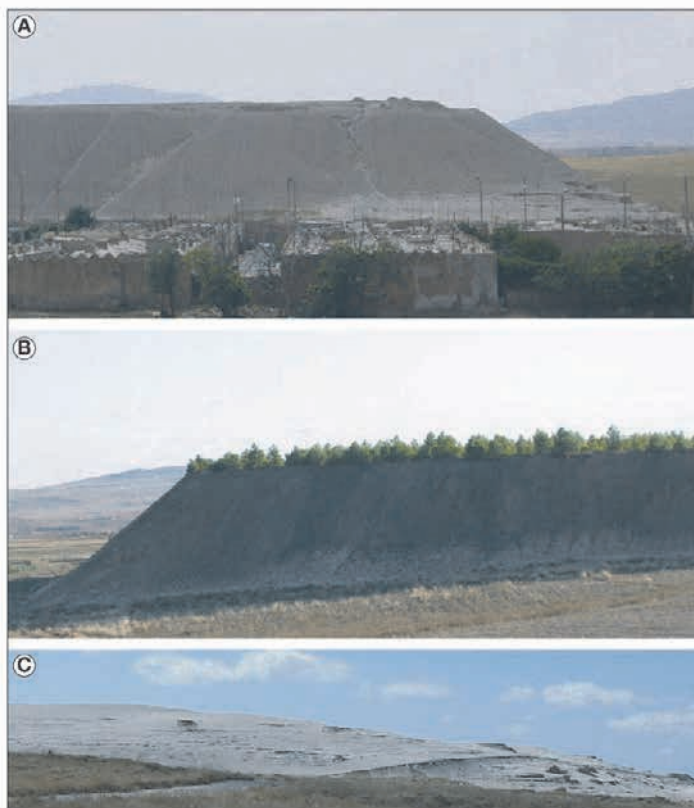


Figure 3. Sites de Touissit et Boubker.

Figure 3. Touissit and Boubker sites.

A) digue de sable aux abords du village de Touissit ; B) reboisement avec de l'Acacia et du Pin au niveau d'une digue recouverte par du stérile ; C) digue de sable à proximité d'un champ de blé dans la région de Boubker.

entre 171 et 2 256 ppm pour le Zn. Les teneurs en As, Cd et Cu sont comparables à celles trouvées dans la région de Cabezo Rajao en Espagne par Navarro *et al.* (2008). En revanche, les teneurs en Pb et Zn sont nettement supérieures à celles rapportées par ces auteurs.

La région d'Oued El Heimer, où se situe la fonderie, présente des teneurs en As situées entre 7 et 411 ppm, en Cd entre 0,1 et 164,5 ppm, en Cu entre 0,3 et 531,6 ppm et en Ni entre 0,1 et 34,4 ppm. Cette région se caractérise par de fortes teneurs en Zn et Pb en particulier au niveau des scories. Ces valeurs varient entre 10 et 26 776 ppm pour le Zn et entre 26 et 9 478 ppm pour le Pb. Bien que ces valeurs semblent élevées,

des concentrations en Pb et Zn plus importantes ont été rapportées, en particulier autour de certaines fonderies (Baker *et al.*, 1994 ; Saïdi, 2004).

Des variations importantes dans les concentrations en ETM pour les différents sites et pour les différentes stations soulignent une grande hétérogénéité. Ainsi, les échantillons OH8 à OH11, présentant globalement les teneurs les plus élevées en ETM, correspondent à des scories issues de la fonderie. Cependant, il existe une grande hétérogénéité des teneurs en ETM au sein d'une même classe de substrat. Par exemple, les digues de sable (Toui2, Toui6, Bou1 et Bou2) présentent une variation importante dans leur composition en Pb allant de 84 à 3 309 ppm.

La variation des concentrations en ETM entre les sites et même entre les différentes zones d'un même site semble être une caractéristique de la pollution des sites miniers. Ernst et Nelissen (2000) ont montré que les concentrations en métaux totaux dans les sols orogéniques, ainsi que dans les sols proches des fonderies, sont très élevées mais très variables d'un site à l'autre.

Les échantillons récoltés aux abords de la fonderie d'Oued El Heimer, et en particulier au niveau des scories, présentent des concentrations plus élevées en As, Cd, Pb et Zn que dans les deux régions minières décrites. Les teneurs en Cu et Ni sont également importantes. De nombreux auteurs ont montré que les régions à proximité des fonderies sont extrêmement polluées par les émissions de particules riches en ETM durant le processus de fusion et leur accumulation subséquente à la surface du sol (Li et Thornton, 1993 ; Bloemen *et al.*, 1995 ; Dudka *et al.*, 1996). Les sols des sites de fonderies causent plus de problèmes environnementaux que les sites d'extraction, du fait que, dans ces zones, les métaux sont plus mobiles et biodisponibles (Li et Thornton, 1993).

Dans les sols d'une mine de Pb et Zn en Corée du Sud, des concentrations en Zn variant entre 329 et 25 800 ppm ont été trouvées (Jung et Thornton, 1996). Ces valeurs rentrent dans l'intervalle de variation des résidus de la région étudiée. Par ailleurs, Li et Thornton (1993) ont rapporté des concentrations en Zn atteignant 45 900 ppm dans la région minière de Shipham en Grande-Bretagne. Dans le district minier de Zaïda, Saïdi (2004) rapporte des concentrations en Zn allant jusqu'à 409 741 ppm et Boularbah *et al.* (2006) présente des valeurs en Zn de 108 000 ppm dans les résidus d'une mine polymétallique de la région de Guemassa au Maroc. Ces valeurs sont plus élevées que celles trouvées dans les sites étudiés. Les concentrations en Pb dans notre site d'étude sont normalement élevées puisqu'il s'agit de mines et de sites d'exploitation dédiés au Pb, au Zn et à l'Ag. Dans d'autres études, plusieurs équipes ont trouvé des teneurs plus importantes en Pb dans les déchets miniers. Li et Thornton (1993) ont rapporté des concentrations en Pb variant de 3 280 à 28 900 ppm dans une région minière de Pb et Zn, en Grande-Bretagne. Saïdi (2004) et Boularbah *et al.* (2006) rapportent respectivement des valeurs de 73 936 et 30 100 ppm de Pb dans des résidus de fonderies, situées dans l'Atlas marocain.

Tableau 1. Description des échantillons analysés.

Table 1. Description of analyzed samples.

Site	Code	pH	Coordonnées GPS	Nature de l'échantillon
Témoin	Tem1	7,7	alt : 995 m N 34° 27 30' W 001° 53 46'	Sol végétalisé
	Tem2	7,7	alt : 1 134 m N 34° 28 15' W 001° 46 34'	Sol végétalisé
Oued El Heimer	OH1	7,3	alt : 981 m N 34° 26 59' W 001°53 97'	Sol végétalisé
	OH2	6,7	alt : 981 m N 34° 26 59' W 001°53 97'	Sol végétalisé
	OH3	7,1	alt : 981 m N 34° 26 59' W 001°53 97'	Sol végétalisé
	OH4	7,0	alt : 981 m N 34° 26 59' W 001°53 97'	Sol végétalisé
	OH5	7,6	alt : 981 m N 34° 26 59' W 001°53 97'	Sol végétalisé
	OH6	5,5	alt : 981 m N 34° 26 59' W 001°53 97'	Sol végétalisé
	OH7	7,7	alt : 981 m N 34° 26 59' W 001°53 98'	Sol végétalisé sous pinède
	OH8	7,1	alt : 959 m N 34° 26 88' W 001° 54 03'	Scories issues de la fonderie
	OH9	6,1	alt : 959 m N 34° 26 88' W 001° 54 03'	Scories issues de la fonderie
	OH10	7,9	alt : 961 m N 34° 24 88' W 001° 54 02'	Scories issues de la fonderie
	OH11	7,2	alt : 961 m N 34° 24 88' W 001° 54 01'	Scories issues de la fonderie
Touissit	Toui1	7,7	alt : 1 132 m N 34° 28 26' W 001° 46 19'	Stérile recouvrant la digue
	Toui2	7,6	alt : 1 134 m N 34° 28 15' W 001° 46 34'	Digue de sable (résidu de traitement du minerai)
	Toui3	7,2	alt : 1 134 m N 34° 28 15' W 001° 46 34'	Stérile recouvrant la digue
	Toui4	7,2	alt : 1 064 m N 34° 27 93' W 001° 46 75'	Stérile recouvrant la digue
	Toui5	7,4	alt : 1 055 m N 34° 26 49' W 001° 48 22'	Stérile
	Toui6	6,9	alt : 1 160 m N 34° 28 61' W 001° 45 42'	Digue de sable (résidu de traitement du minerai)
	Toui7	6,8	alt : 1 160 m N 34° 28 61' W 001° 45 42'	Stérile recouvrant la digue
Boubker	Bou1	7,7	alt : 1 200 m N 34° 28 34' W 001° 42 99'	Digue de sable (résidu de traitement du minerai)
	Bou2	7,8	alt : 1 189 m N 34° 28 31' W 001° 43 21'	Digue de sable (résidu de traitement du minerai)

Pour le Cu, Bennisse *et al.* (2005) rapportent des teneurs atteignant 424 ppm dans la région minière de Draâ Sfar au Maroc. Cette valeur est comparable à la concentration trouvée dans les scories d'Oued El Heimer. Par ailleurs, des concentrations atteignant 1 400 et 1 899 ppm ont été trouvées respectivement près du site minier de Sambo en Corée du Sud (Jung et Thornton, 1996) et dans les résidus de fonderies du district minier de Zaïda (Saïdi, 2004).

Les travaux de Navarro *et al.* (2008) ont mis en évidence des concentrations en Cd atteignant 332 ppm dans les sols prélevés à partir d'une ancienne région minière de Pb-Zn en Espagne. Fuge *et al.* (1993) ont trouvé des valeurs de 980 ppm de Cd dans des sols près des mines métallifères au Pays de Galles. Saïdi (2004) rapporte des concentrations en Cd de 1 046 ppm dans le site minier de Mibladen au Maroc. Ces valeurs sont nettement plus élevées que celles trouvées dans les régions d'Oued El Heimer, Touissit et Boubker. Cependant, certains auteurs ont trouvé des valeurs en Cd proches de nos résultats. Ainsi, Boularbah *et al.* (2006) et

Lim *et al.* (2007) rapportent respectivement des concentrations de 228 ppm et de 20 ppm en Cd.

Dans notre étude, excepté pour le Ni, la concentration en ETM dans les sols témoins est inférieure ou proche de la moyenne mondiale des sols non contaminés (tableau 2, VN). En revanche, la majorité des sols issus des zones qui présentent une activité minière ont des concentrations élevées en un ou plusieurs de ces éléments. Ces concentrations élevées en EMT sont donc directement liées aux activités minières qui durent depuis des décennies dans la région. Des résultats similaires ont été trouvés par de nombreux auteurs (Matthews et Thornton, 1982 ; Saïdi, 2004).

Index de pollution par les ETM dans les sols

La concentration critique du sol est définie comme étant la valeur au-dessus de laquelle la toxicité est possible. Ces valeurs sont de 8 ppm pour le Cd, 125 ppm pour le Cu et 400 ppm pour le Pb et le Zn (Kabata-Pendias et Pendias,

1992). Dans notre étude, les résultats obtenus montrent que les concentrations en métaux sont au-dessus du niveau critique dans la plupart des stations. Quarante-vingts pour cent des stations présentent des valeurs supérieures au seuil critique pour au moins trois de ces éléments. Les scories d'Oued El Heimer et les digues de Touissit et Boubker sont particulièrement riches en ces quatre éléments. Ces sols sont également riches en As. Néanmoins, la toxicité de cet élément est difficile à apprécier dans le sol puisqu'elle dépend de sa biodisponibilité, généralement très faible¹.

La pollution par les métaux dans les sites miniers est généralement associée à une contamination multiple qui augmente considérablement le degré de toxicité des sols (Nimick et Moor, 1991 ; Chon *et al.*, 1998). L'index de pollution (IP) est un critère permettant d'évaluer la toxicité d'un sol. Il permet d'identifier une contamination de type multielementaire dans les échantillons (Chon *et al.*, 1998). Cet index

¹ Conseil canadien des ministres de l'environnement Extrait de la publication 1999 : 1300, ISBN 1-696997-36-8.

Tableau 2. Concentration en éléments-traces métalliques (ETM) (As, Cd, Cu, Ni, Pb et Zn) (mg/kg) et indice de pollution (IP) dans les échantillons.

Table 2. Amount of metallic trace elements (MTE) (mg/kg) and pollution index (IP) in samples.

Site	Station	As	Cd	Cu	Ni	Pb	Zn	IP
Témoin	Tem1	37	nd	15	26	286	106	0,84
	Tem2	nd	nd	7	21	24	9	0,08
Oued El Heimer	OH1	21	nd	86	34	4 685	781	12,58
	OH2	7	9	10	1	725	96	2,66
	OH3	16	1	4	2	53	302	0,43
	OH4	10	1	1	nd	26	527	0,55
	OH5	16	2	3	nd	58	10	0,37
	OH6	16	4	8	1	125	1 146	1,60
	OH7	30	12	67	2	4 174	2 231	11,82
	OH8	249	7	134	6	7 179	17 786	33,73
	OH9	201	17	336	6	7 407	11 210	30,09
	OH10	411	5	509	26	9 479	26 776	47,69
	OH11	331	165	533	15	4 562	886	27,18
Touissit	Toui1	11	4	100	nd	1 212	171	3,80
	Toui2	14	3	32	nd	264	206	1,19
	Toui3	13	nd	223	nd	7 458	725	19,81
	Toui4	47	15	766	3	1 817	315	7,96
	Toui5	101	11	643	9	3 083	252	10,48
	Toui6	187	18	2 243	3	3 309	472	15,78
	Toui7	15	13	31	nd	197	795	2,29
Boubker	Bou1	66	58	148	nd	355	2 256	7,93
	Bou2	76	37	53	2	84	1 388	4,57
VN		6	0,35	30	5	35	90	

nd : limite de détection de l'analyse par IPC-AES (inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry) ; IP : indice de pollution ; VN : valeurs normales selon Bowen (1979).

est calculé par le rapport des concentrations des métaux dans le sol sur la base de valeurs ajustées correspondant aux niveaux tolérables des concentrations en métaux dans le sol ($IP = (Cd/3 + Cu/100 + Pb/100 + Zn/300)/4$). Ainsi, un IP supérieur à 1 correspond à un sol pollué.

Dans le cas de cette étude, l'indice de pollution a été calculé pour les différents sites de prélèvement et les résultats sont reportés dans le *tableau 1*. Pour les stations où la concentration en Cd est inférieure au seuil de détection, la valeur est considérée comme nulle.

Les résultats obtenus montrent des valeurs d'IP très variables d'une station à une autre. Ces valeurs sont comprises entre 0,43 et 47,69. Les indices les plus bas sont obtenus sur les sols témoins et quelques sols végétalisés d'Oued El Heimer. En outre, sur les 22 échantillons testés, 17 ont des IP supérieurs à 1, confirmant la forte contamination de notre site d'étude par les ETM. Des valeurs similaires sont fréquemment observées dans les

régions qui présentent des activités minières. Jung (2001) et Lee *et al.* (2001) rapportent des valeurs d'IP supérieures à 1 dans les sols de plusieurs régions minières en Corée. Saïdi (2004) présente des valeurs d'IP atteignant 14 dans les mines de Zaïda. Bien que dans la région étudiée les concentrations en Pb et Zn soient inférieures aux sols de Zaïda, les IP sont, pour certains échantillons, nettement supérieurs à ceux trouvés par Saïdi (2004). Sur les 20 sites pollués, 85 % des échantillons analysés ont un IP supérieur à 1, et 45 % sont très fortement pollués avec un IP supérieur à 10. Les IP les plus élevés sont enregistrés au niveau des scories aux abords de la fonderie, soulignant le caractère extrêmement toxique de ces milieux. Une analyse statistique non paramétrique (test de Wilcoxon, Statistica 7) révèle une très forte corrélation entre la valeur d'IP et les teneurs en Pb et Zn dans les milieux étudiés, et, dans une moindre mesure, avec l'As, donnant un poids particulier à ces trois éléments

dans la toxicité des substrats. Ces résultats montrent que la combinaison de métaux présents dans les sols de la région de Touissit, Boubker et Oued El Heimer est extrêmement toxique. Ces ETM fournissent une source de dispersion continue et peuvent être à l'origine d'une pollution endémique de la région.

Conclusion

L'analyse de la composition en métaux des sols (sols végétalisés, digues, stériles et scories) des sites miniers de Touissit et Boubker et de la fonderie d'Oued El Heimer a révélé des taux élevés en ETM. L'indice de pollution, souvent très élevé, montre que la combinaison en métaux dans les sols de la région est une source potentielle de toxicité pour la flore, la faune et les habitants. En plus des activités minières, ces régions connaissent une activité agricole vivrière à prendre en

considération. On y dénombre plusieurs cultures céréalières ainsi que des plantations d'arbres fruitiers (oliviers, pruniers et pommiers). L'activité pastorale est également omniprésente autour des agglomérations. Ces activités constituent une voie d'entrée des ETM dans la chaîne alimentaire et augmentent ainsi le risque de contamination de la population.

Malgré l'environnement hostile du milieu, plusieurs essences végétales ont été observées sur les sites et sont parfaitement adaptées aux conditions édapho-climatiques de la région. Ces espèces dites métallophiles participent à la fixation des sols et minimisent ainsi la dissémination des ETM sous l'effet de l'érosion. Certaines de ces plantes ont mis en place des processus adaptatifs leur permettant de tolérer de fortes teneurs en ETM dans le sol. Parmi celles-ci, on peut distinguer les plantes accumulatrices de métaux. Ces plantes présentent un potentiel important pour le développement de stratégies de réhabilitation des sites miniers par des approches de phytoremédiation. ■

Références

- Baker A.J.M., Reeves R.D., Hajar A.S.M. Heavy metal accumulation and tolerance in British populations of the metallophyte *Thlaspi caerulescens* J. & C. Presl (Brassicaceae). *New Phytol* 1994; 127: 61-8.
- Basta NT, Pantone DJ, Tabatabai MA. Path analysis of heavy metal adsorption by soil. *Agron J* 1993; 85: 1054-7.
- Bell FG, Bullock SET, Hälbich TFJ, Lindsay P. Environmental impacts associated with an abandoned mine in the Witbank Coalfield, South Africa. *Int J Coal Geol* 2001; 45: 195-216.
- Bennisse R, Labat M, Elasi A, et al. Rhizosphere bacterial populations of metallophyte plants in heavy metal-contaminated soils from mining areas in semiarid climate. *World J Microb Biot* 2006; 20: 759-66.
- Bloemen ML, Markert B, Lieth H. The distribution of Cd, Cu, Pb and Zn in topsoils of Osnabrück in relation to land use. *Sci Tot Environ* 1995; 166: 137-48.
- Boularbah A, Schwartz C, Bitton G, Morel JL. Heavy metal contamination from mining sites in South Morocco: 1. Use of a biotest to assess metal toxicity of tailings and soils. *Chemosphere* 2006; 63: 802-10.
- Bowen HYM. *Environmental chemistry of element*. London: Academic Press, 1979.
- Chon HT, Ahn JS, Jung MC. Seasonal variations and chemical forms of heavy metals in soils and dusts from the satellite cities of Seoul. *Environ Geochem Hlth* 1998; 20: 77-86.
- Dudka S, Piotrowska M, Terelak H. Transfer of cadmium, lead and zinc from industrially contaminated soil to crop plants: a field study. *Environ Pollut* 1996; 94: 181-8.
- Ernst WHO, Nelissen HJM. Life-phase of a zinc- and cadmium-resistant ecotype of *Silene vulgaris* in risk assessment of polymetallic mine soils. *Environ Pollut* 2000; 107: 329-38.
- Essington ME, Foss JE, Roh Y. The soil mineralogy of lead at Horace' Villa soil. *Sci Sol Am J* 2004; 68: 979-93.
- Fuge R, Pearce FM, Pearce NJG, Perkins WT. Geochemistry of Cd in the secondary environment near abandoned metalliferous mines, Wales. *Appl Geochem* 1993; 2: 29-35.
- Jung MC, Thornton I. Heavy metal contamination of soils and plants in the vicinity of a lead-zinc mine, Korea. *Appl Geochem* 1996; 11: 53-9.
- Jung MC. Heavy metal contamination of soils and waters in and around the Imcheon Au-Ag mine, Korea. *Appl Geochem* 2001; 16: 1369-75.
- Kabata-Pendias A, Pendias H. *Trace elements in soils and plants*. Boca Raton (Floride, États-Unis): CRC Press, 1992.
- Lee CG, Chon HT, Jung MC. Heavy metal contamination in the vicinity of the Daduk Au-Ag-Pb-Zn mine in Korea. *Appl Geochem* 2001; 16: 1377-86.
- Lee JS, Chon HT. Exposure assessment of heavy metals on abandoned metal mine areas by ingestion of soil, crop plant and groundwater. *J Phys IV France* 2003; 107: 757.
- Li X, Thornton I. Multi-element contamination of soils and plants in old mining areas, U.K. *Appl Geochem* 1993; 2: 51-6.
- Lim HS, Lee JS, Chon HT, Sager M. Heavy metal contamination and health risk assessment in the vicinity of the abandoned Songcheon Au-Ag mine in Korea. *J Geochem Explor* 2007; 96: 223-30.
- Margui E, Queralt I, Carvalho ML, Hidalgo M. Comparison of EDXRF and ICP-OES after microwave digestion for element determination in plant specimens from an abandoned mining area. *Anal Chim Acta* 2005; 549: 197-204.
- Matthews HJ, Thornton AK. Seasons and species variation in the content of cadmium and associated metals in pasture at Shipham. *Plant Soil* 1982; 66: 191-3.
- Moreno JL, Garcia C, Hernandez T, Pascual JA. Transference of heavy metals from a calcareous soil amended with sewage-sludge compost to barley plants. *Bioresource Technol* 1996; 55: 251-8.
- Navarro MC, Pérez-Sirvent C, Martínez-Sánchez MJ, Vidal J, Tovar PJ, Bech J. Abandoned mine sites as a source of contamination by heavy metals: A case study in a semi-arid zone. *J Geochem Explor* 2008; 96: 183-93.
- Nimick DA, Moor JM. Prediction of water-soluble metal concentrations in fluviially deposited tailings sediments, Clark Fork Valley, Montana, USA. *Appl Geochem* 1991; 6: 635-46.
- Passariello B, Giuliano V, Quaresima S, et al. Evaluation of the environmental contamination at an abandoned mining site. *Microchem J* 2002; 73: 245-50.
- Pichtel J, Kuroiwa K, Sawyerr HT. Distribution of Pb, Cd and Ba in soils and plants of two contaminated sites. *Environ Pollut* 2000; 110: 171-8.
- Rybicka EH, Jedrzejczyk B. Preliminary studies on mobilisation of copper and lead from contaminated soils and readsorption on competing sorbents. *Appl Clay Sci* 1995; 10: 259-68.
- Saïdi N. *Le bassin-versant de la Moulouya : pollution par les métaux lourds et essais de phytoremédiation*. Thèse d'État, université Mohammed V, Rabat (Maroc), 2004.
- Schwartz C, Gerard E, Perronnet K, Morel JL. Measurement of *in situ* phytoextraction of zinc by spontaneous metallophytes growing on a smelter site. *Sci Tot Environ* 2001; 279: 215-21.
- Wajdini A. Le plomb au Maroc : cas des districts de Toudist et Jbel Aouam. *Chimie Recherche Minière* 1998; 532: 9-28.

3) Inventaire floristique et teneurs en ETMs des plantes endémiques

Malgré une forte pollution polymétallique des différents types de sols analysés, nous avons pu observer la présence de plantes aussi bien sur les scories de la fonderie que sur les digues non recouvertes. Un inventaire floristique des plantes prépondérantes sur les sites précédemment décrits a été mené. Cet inventaire s'est accompagné d'une analyse de la teneur en ETMs dans les parties aériennes des plantes prélevées.

3-1) Sites de prélèvements

Cette étude a porté sur les trois sites pollués par les ETMs (dignes de déchets des mines de Touissit et Boubker, fonderie de Oued el Himer) et sur un site témoin éloigné de plusieurs kilomètres et apparemment exempt de pollution.

La digue de Touissit (coordonnées GPS : Alt : 1134m, N 34° 28 15' W 001° 46 34') est une digue recouverte avec du stérile (sol extrait avant d'accéder au gisement de minerai et ne contenant pas suffisamment de minerai pour être exploité) où des essais de revégétalisation avec du pin et de l'acacia ont été tentés, il y a une dizaine d'années (fig. 12).



Figure 12 : Digue de Touissit recouverte par du stérile et revégétalisée avec du pin et de l'acacia.

La digue de Boubker (coordonnées GPS : Alt : 1182m N 34° 28 37' W 001° 43 50') est une digue recouverte partiellement de stérile. Le recouvrement de la digue a été commencé sur un des côtés de la digue puis abandonné par la suite (fig. 13). Les prélèvements ont été faits au sommet de la digue directement sur les résidus de traitement.



Figure 13 : Digue de Boubker recouverte partiellement par du stérile sur les côtés.

Concernant les prélèvements de la fonderie de Oued el Himer, ils ont été faits principalement sur 2 zones : les scories (déchets de la fonderie) stockées tout autour de la fonderie (fig. 14, coordonnées GPS : Alt: 959m, N 34° 24 88' W 001°54 03') et une zone située à 500 m de la fonderie composée d'un bois de pins traversé par un couloir non boisé sous le vent dominant (fig. 15, coordonnées GPS : Alt: 981, N 34° 26 59' W 001° 53 97').



Figure 14 : Fonderie de Oued el Himer, entourée de dépôt de scories.



Figure 15 : Fonderie de Oued el Himer, pinède et couloir sous le vent dominant.

3-2) Inventaire floristique

Soixante sept échantillons de plantes ont été prélevés sur les différents sites de la zone d'étude. L'identification des espèces prélevées est en cours (Pr. Ater M., Université de Tétouan, Maroc ; tab. 3).

3-2-1) Zone témoin

Sur ce site, deux échantillons ont été prélevés appartenant au genre *pinus* et à l'espèce *Quercus ilex*.

3-2-2) Fonderie de Oued el Himer

Sur ce site, 36 échantillons ont été prélevés. Les prélèvements ont été effectués dans la zone située à 500 m de la fonderie dans la pinède et le couloir non boisé, excepté pour les échantillons identifiés comme étant *Hirschfeldia incana* qui ont été prélevés directement sur les scories.

Seize échantillons ont été identifiés comme appartenant à 4 familles différentes : deux composées, une brassicacée, deux poacées et deux fabacées. Ensuite, deux échantillons ont été identifiés comme appartenant au genre *Pinus*. Et enfin, dix-huit échantillons ont été identifiés avec plus de précision comme appartenant à six espèces : *Cistus libanotis*, *Hirschfeldia incana*, *Lavandula dentata*, *Noea mucronata*, *Artemisia herba-alba* et *Hedysarum spinosissimum*.

3-2-3) Digue de Touissit

Cette digue est recouverte par du stérile et des essais de revégétalisation y ont été menés avec des pins et des acacias que l'on retrouve naturellement dans cet inventaire (14 échantillons). Aux pieds de ces arbres, onze échantillons ont été identifiés comme appartenant à deux espèces : *Hedysarum spinosissimum* (déjà identifié sur le site de la fonderie) et *Phragmites communis*.

3-2-4) Digue de Boubker

Sur cette digue non recouverte, seulement 6 échantillons ont été prélevés et identifiés comme appartenant au genre *Capsella* et à l'espèce *Dittrichia viscosa*. Ce n'est pas très surprenant de trouver aussi peu de plantes sur cette digue composée exclusivement de résidus de traitement.

3-3) Teneurs en ETM des plantes

Les parties aériennes des échantillons ont été lavées à l'eau distillée puis séchées, puis la teneur en As, Cd, Cu, Ni, Pb et Zn a été déterminée par ICP-AES (Unité d'Appui Technique à la Recherche Scientifique, CNRST, Rabat).

Les ETMs ont été analysés dans les parties aériennes des plantes prélevés dans le site d'étude (tab.3). Sur l'ensemble du site, aucune plante n'atteint le seuil d'hyperaccumulation pour le Cd ($>0,01$ % MS), As, Cu, Ni ($>0,1$ % MS) et le Zn (>1 % MS). Par contre, concernant le Pb, trois plantes ont des niveaux supérieurs au seuil d'hyperaccumulation ($>0,1$ % MS) : *Cistus libanotis*, l'astéracée 1 et la poacée 1 avec des teneurs en Pb respectivement de 1371, 1481 et 1280 mg/Kg de MS. Deux plantes ont des teneurs proches de ce seuil : *Artemisia herba-alba* et *Hirschfeldia incana* avec des teneurs moyennes en Pb respectivement de 926 et 792 mg/Kg de MS. Ensuite, plusieurs plantes accumulent le Pb de façon significative comme *Dittrichia viscosa*, *Noea mucronata*, les fabacées et la brassicacée.

Il faut noter que les teneurs en Pb des plantes prélevées dans la zone témoin (pin et chêne vert) ne sont pas négligeables, 340 et 142 mg/Kg respectivement. Ces échantillons ont été prélevés sur le secteur qui présente la plus forte pollution dans la zone témoin (coordonnées GPS, Alt : 995, N 34° 27 30' W 001° 53 46'U ; Smouni *et al.*, 2010) ce qui peut expliquer ces teneurs en Pb au niveau des parties aériennes. Il ne faut pas écarter, non plus, la possibilité d'une pollution aérienne.

Tableau 3 : Teneurs en ETM (en mg/Kg de MS) dans les feuilles des plantes prélevées sur les différents sites d'étude. Les teneurs en ETM ont été déterminées par ICP-AES. Les résultats sont les valeurs moyennées du nombre de plantes prélevées (Smouni *et al.*, Résultats non publiés). Entre parenthèse est indiqué le nombre de plantes prélevées. En jaune, les valeurs qui dépassent la valeur seuil pour une plante hyperaccumulatrice (1000 mg de Pb/Kg de MS).

Site	Plante	As	Cd	Cu	Ni	Pb	Zn
Zone témoin	<i>Quercus ilex</i> (1)	1,85	0,83	3,43	0,24	141,94	15,49
	<i>Pinus</i> (1)	2,00	2,27	4,77	0,24	340,39	18,12
Oued el Himer	<i>Noea mucronata</i> (4)	3,92	4,45	6,53	0,58	606,08	45,37
	<i>Cistus libanotis</i> (2)	9,67	8,28	12,95	0,87	1371,91	693,44
	<i>Hirschfeldia incana</i> (7)	26,82	39,59	26,67	2,40	792,52	109,39
	<i>Lavandula dentata</i> (3)	12,12	9,80	36,16	2,12	150,12	1536,05
	<i>Artemisia herba-alba</i> (1)	5,91	5,91	15,72	0,70	926,14	76,96
	<i>Hedysarum spinosissimum</i> (1)	1,84	1,11	3,09	0,26	126,35	12,99
	<i>Pinus</i> (2)	3,16	2,97	4,67	0,21	211,54	353,00
	Poacée 1 (2)	17,53	35,76	38,87	4,42	1280,92	2547,00
	Poacée 2 (2)	3,56	3,25	4,89	1,97	38,47	344,92
	Fabacée 1 (2)	2,78	4,23	7,90	0,59	440,80	57,37
	Fabacée 2 (7)	5,25	5,56	8,16	0,75	580,73	73,00
	Astéracée 1 (1)	9,31	11,15	17,55	1,12	150,73	910,26
	Astéracée 2 (1)	12,79	12,54	17,50	1,27	1481,14	189,84
	Brassicacée (1)	3,48	0,85	11,59	0,45	632,15	32,80
Touissit	<i>Hedysarum spinosissimum</i> (5)	2,71	0,65	10,87	0,16	224,93	89,40
	<i>Phragmites communis</i> (6)	1,19	0,32	13,81	1,15	144,38	80,48
	<i>Acacia</i> (6)	1,17	0,14	6,26	0,24	25,92	45,64
	<i>Pinus</i> (8)	1,36	0,52	5,72	0,23	93,47	77,73
Boubker	<i>Dittrichia viscosa</i> (4)	9,59	5,09	15,48	0,64	406,44	1206,32
	<i>Capsella</i> (2)	0,22	0,10	0,36	-	4,14	28,64

3-4) Choix du modèle d'étude

L'objectif de cet inventaire était double : d'une part, identifier des plantes endémiques à la zone d'étude, tolérantes au Pb et donc susceptibles d'être introduites dans un projet de phytoremédiation et, d'une autre part, parmi celles-ci, préciser une plante qui puisse être utilisé pour identifier des gènes impliqués dans la tolérance et l'accumulation du Pb.

Plusieurs plantes pourraient être de bons candidats pour la phytoremédiation : *Cistus libanotis*, l'astéracée 1, la poacée 1, *Artemisia herba-alba*, *Hirschfeldia incana*, *Dittrichia viscosa* et *Noea mucronata*. Ainsi, *Dittrichia viscosa* est connue pour être une plante accumulatrice de Zn et de Pb (Melendo *et al.*, 2002 ; Nogales *et al.*, 2006) mais son facteur de bioconcentration (FBC) est inférieur à 1 ce qui en ferait plutôt un candidat pour la phytostabilisation. *Noea mucronata* a été décrit comme accumulatrice de Pb et de Zn

(Chehregani *et al.*, 2009). De plus, sa toxicité pourrait en faire un bon candidat pour un programme de phytoremédiation dans la mesure où elle n'est pas broutée par le bétail (Nahal, 2004). Les *Artemisia* sont connus pour être des plantes accumulatrices de Cd, Cu, Pb et Zn (Alirzayeva *et al.*, 2006). De même, il a été montré qu'*Hirschfeldia incana* accumule le Pb et le Cu dans ses parties aériennes (Gisbert *et al.*, 2006 ; Poschenrieder *et al.*, 2001). Del Rio-Celestino *et al.*, 2006 a également montré qu'*H. incana* accumule le Zn et le Pb autant dans ses racines que dans ses feuilles, et a donc un facteur de bioconcentration (FBC) quasiment égal à 1 mais lorsque la biomasse est prise en compte, elle peut extraire plus de 15 mg de Zn et 10 mg de Pb par plante, ce qui en fait un candidat de choix pour la phytoextraction. Par contre, il n'existe aucune référence bibliographique sur la capacité d'accumulation d'ETMs par *Cistus libanotis*. Des études complémentaires ont été menées par l'équipe pour vérifier ce niveau d'accumulation et, suite aux résultats obtenus, un brevet international concernant son utilisation en phytoremédiation a été déposé (N°09 305 421 « Use of *Cistus libanotis* to clean heavy metals containing soils »).

La difficulté concerne notre second objectif qui est de mettre en évidence des mécanismes moléculaires de la tolérance au Pb. En effet, cela impose un certain nombre de critères tels que la nécessité d'avoir une plante facile à manipuler en laboratoire et pour laquelle on dispose de données moléculaires.

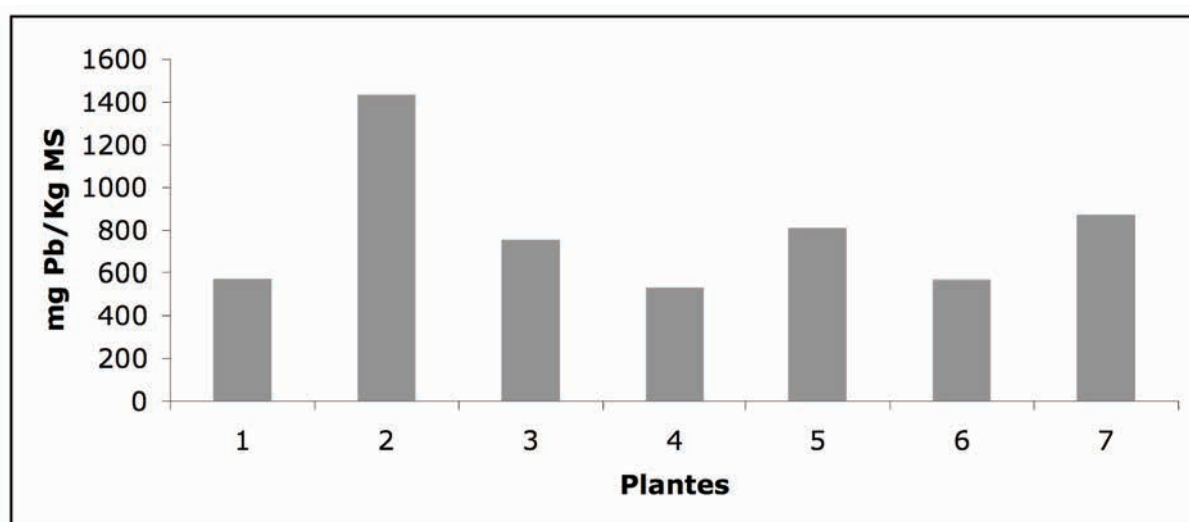


Figure 16 : Concentrations en Pb (en mg/Kg de MS) dans les feuilles des sept plants d'*Hirschfeldia incana* prélevées sur les scories de la fonderie de Oued el Himer.

Ces caractéristiques vont imposer le choix d'*Hirschfeldia incana*. C'est une plante qui présente une accumulation importante en plomb dans les parties aériennes pouvant atteindre 1400 mg de Pb/Kg de MS (fig. 16). Sur la base de nos résultats obtenus à partir de la séquence ITS de *H. incana*, c'est une brassicacée très proche de *Brassica nigra* et proche d'*Arabidopsis thaliana* (fig. 17). Cette proximité génétique va permettre d'avoir accès aux outils mis en place pour cette plante modèle (génomé séquencé et annoté, banque de mutants d'insertion). *H. incana* est facile à manipuler en laboratoire (extraction des acides nucléiques et culture *in vitro* aisées), elle a une croissance rapide et un cycle végétatif court (2 mois graine à graine). C'est une métallophyte facultative puisqu'elle pousse directement sur les scories plombifères (fig. 18) et sur des sols non pollués.

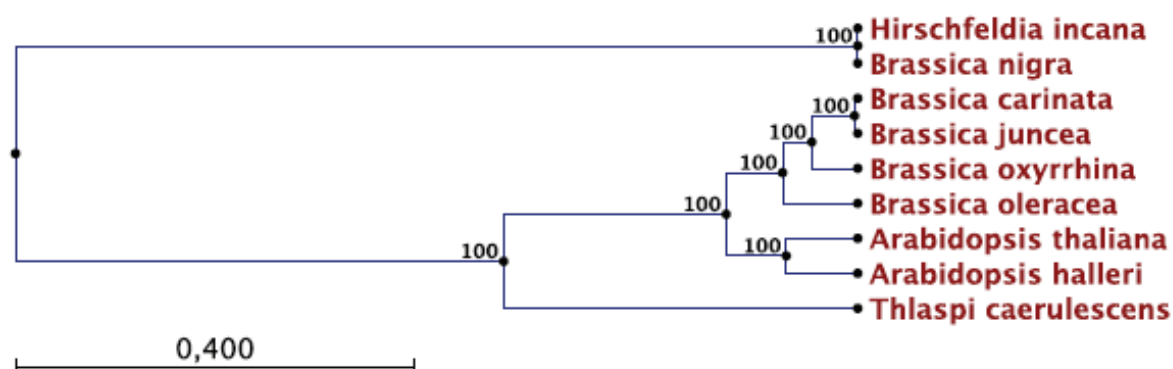


Figure 17 : Dendrogramme upgma réalisé à partir de l'alignement de la séquence de l'espaceur intergénique (ITS) isolée chez *H. incana* et les séquences de *Brassica nigra*, *B. carinata*, *B. juncea*, *B. oxyrrhina*, *B. oleracea*, *Arabidopsis thaliana*, *A. halleri* et *Thlaspi caerulescens*. L'alignement a été réalisé à l'aide du logiciel Clustal.



Figure 18 : *H. incana* poussant directement sur les scories de la Fonderie de Oued el Himer.

Hirschfeldia incana (L.) Lagrèze-Fossat est une dicotylédone, bisannuelle et allogame. Elle peut atteindre jusqu'à 1,50 m de haut. Sa formule chromosomique est $2n=14$. Elle est thermophile et neutrophile. La zone de répartition naturelle d'*H. incana* s'étend du

pourtour méditerranéen jusqu'en Asie du sud-ouest où elle colonise les friches, les bords de chemin et les décombres. Ces feuilles sont même consommées en salade dans certaines régions d'Italie (Siemens, 2011). Son nom commun est le faux rapistre blanchâtre ou la roquette bâtarde. On peut la confondre avec le rupestre rugueux (*Rapistrum rugosum*) mais la forme de leur silique permet de les différencier. En effet, la silique d'*H. incana* est courte avec un bec court et renflé alors que celle de *R. rugosum* est une silique hérissée en deux parties, une partie inférieure oblongue et une partie supérieure sphérique (fig. 19).



Figure 19 : Siliques d'*Hirschfeldia incana* (A) et de *Rapistrum rugosum* (B).

Toutes ces caractéristiques peuvent nous laisser espérer qu'*H. incana* pourrait être un bon candidat pour un programme de phytoremédiation et, de plus, elle pourrait servir à identifier des gènes impliqués dans les mécanismes de la tolérance et de l'accumulation du Pb.

Chapitre 3

**La tolérance et
l'accumulation du Pb chez
Hirschfeldia incana, une
brassicacée méditerranéenne**

Le développement de programmes de phytoremédiation des sols pollués par le Pb se heurte à deux verrous : une faible diversité des plantes tolérantes et une méconnaissance des mécanismes moléculaires associés à cette tolérance. Les premiers résultats ont permis d'identifier *Hirschfeldia incana*, une brassicacée endémique des sites miniers marocains et accumulatrice de Pb.

Dans un premier temps, une caractérisation physiologique a été engagée afin de confirmer le caractère accumulateur de Pb de *H. incana*. Ensuite, grâce à une approche gène candidat, huit séquences d'ADNc d'*H. incana* ont été isolées par homologie de séquences avec le génome d'*Arabidopsis*. Ces gènes codent pour des protéines impliquées dans le transport et la chélation des métaux lourds : MT2a (métallothionéine 2), PCS1 (phytochélatine synthase), GS (glutathion synthase) et de différents transporteurs tels que HMA4 (Heavy Metal ATPase 4), MRP3 (Multidrug Resistance Protein 3), CNGC1 (Cyclin Nucleotid Gated-ion Channel 1) et ATM3 (ABC Transporter Mitochondrial 3). Une analyse de l'expression de ces gènes par PCR quantitative (QPCR) en réponse à des traitements au Pb a été réalisée. L'expression de 2 gènes, *HiHMA4* et *HiHMT2a*, est fortement induite par le traitement au Pb, dans les feuilles et les racines de *H. incana*. Une approche de génétique inverse a été menée afin de vérifier si ces gènes étaient impliqués dans la tolérance au Pb. L'analyse phénotypique des mutants d'insertion d'*Arabidopsis* correspondant à ces deux gènes confirme, pour la première fois, l'implication des gènes *MT2a* et *HMA4* dans la tolérance au Pb.

Ces travaux ont fait l'objet d'un manuscrit : **Florence Auguy**, Mouna Fahr, Patricia Moulin, Anaïs Brugel, Laurent Laplaze, Mohamed El Mzibri, Abdelkarim Filali-Maltouf, Patrick Dumas and Abdelaziz Smouni, Lead tolerance and accumulation in *Hirschfeldia incana*, a Mediterranean *Brassicaceae* from metalliferous mine spoils, soumis à PlosOne.

Lead tolerance and accumulation in *Hirschfeldia incana*, a Mediterranean *Brassicaceae* from metalliferous mine spoils

Florence Auguy^{1, 2, 3}, Mouna Fahr^{2, 3, 4}, Patricia Moulin^{3, 5}, Anaïs Brugel¹, Laurent Laplaze^{1, 6}, Mohamed El Mzibri^{2, 3}, Abdelkarim Filali-Maltouf^{3, 7}, Patrick Doumas^{1, 2, 3, 8, *} and Abdelaziz Smouni^{2, 4}

1 Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UMR DIADE (IRD/UM2), Equipe Rhizogenèse, 911 av. Agropolis, 34394 Montpellier Cedex 5 – France, **2** Centre National de l’Energie, des Sciences et des Techniques Nucléaires, Laboratoire de Biotechnologie des Plantes, UBRM-DSV, B.P. 1382 R.P., 10001 Rabat – Maroc, **3** Laboratoire Mixte International (LMI), Faculté des Sciences, Université Mohammed V - Agdal, 4 av. Ibn Batouta, BP 1014, 10001 Rabat – Maroc, **4** Laboratoire de Physiologie et Biotechnologie Végétale, Faculté des Sciences, Université Mohammed V - Agdal, 4 av. Ibn Batouta, BP 1014, 10001 Rabat – Maroc, **5** IRD, US-IMAGO, Laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire, Faculté des Sciences, Université Mohammed V - Agdal, 4 av. Ibn Batouta, BP 1014, 10001 Rabat – Maroc, **6** IRD, Laboratoire Commun de Microbiologie IRD/ISRA/UCAD, Centre de Recherche de Bel-Air, BP 1386, CP 18524 Dakar – Sénégal, **7** Laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire, Faculté des Sciences, Université Mohammed V - Agdal, 4 av. Ibn Batouta, BP 1014, 10001 Rabat – Maroc, **8** Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), UMR Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes (CNRS, INRA, SupAgro, UM2), 2 place Viala, 34060 Montpellier Cedex 2 – France

* Corresponding author at : Patrick Doumas, Campus INRA / SupAgro, Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, 2 place Viala, 34060 Montpellier Cedex 2 – France

Phone: 0033499613156

Fax: 0033467525737

E-mail: patrick.doumas@supagro.inra.fr

Abstract

Lead is a heavy metal of particular concern with respect to environmental quality and health. The lack of plant species that accumulate and tolerate Pb is a limiting factor to understand the molecular mechanisms involved in Pb tolerance. In this study we identified *Hirschfeldia incana*, a *Brassicaceae* collected from metalliferous mine spoils in Morocco, as a Pb accumulator plant. *H. incana* exhibited high Pb accumulation in mine soils and in hydroponic cultures. Major Pb accumulation occurred in the roots and a part of Pb translocated from the roots to the shoots, even to the siliques. These findings demonstrated that *H. incana* is a Pb accumulator species. The expression of several candidate genes after Pb-exposure was measured by quantitative PCR and two of them, *HiHMA4* and *HiMT2a*, coding respectively for a P_{1B}-type ATPase and a metallothionein, were particularly induced by Pb-exposure in both roots and leaves. The functional characterization of *HiHMA4* and *HiMT2a* was achieved using Arabidopsis T-DNA insertional mutants. Pb content and primary root growth analysis confirmed the role of these two genes in Pb tolerance and accumulation. *H. incana* could be considered as a good experimental model to identify genes involved in lead tolerance and accumulation in plants.

Introduction

Lead (Pb) is a heavy metal of particular concern with respect to environmental quality and health [1]. As a non-essential trace metal for biological functions, it is highly toxic to plants and animals. Sources of anthropogenic soil contamination by Pb include industrial and agricultural activities such as mining and smelting of metalliferous ores, battery-engine waste, wastewater irrigation, and overuse of chemical fertilizers and pesticides [2]. Therefore, the cleanup of Pb-contaminated soils is imperative. In this context, phytoremediation can be considered as a potent tool in the near future. Phytoextraction is based on the genetic and physiological capacity of specialized plants to tolerate high amounts of metal, to translocate from roots to shoots, and to accumulate in shoots [3]. The idea of using plants to remove metals from soils came from the discovery of different wild plants that accumulate high concentrations of metals in their foliage [4]. Currently, phytoremediation of Pb-polluted soils presents two major drawbacks namely, on the one hand, the limited number of species which hyperaccumulate Pb and, on the other hand, the insufficient knowledge of the molecular mechanisms implicated in Pb tolerance in plants.

Over 450 species of metal hyperaccumulator and tolerant plants are known, in both tropical and temperate zones, and most of them are nickel hyperaccumulator [5, 6]. Plant species which hyperaccumulate cobalt, copper or zinc are in second rank, although in much smaller numbers. Hyperaccumulation of arsenic, cadmium, gold, lead, manganese and thallium occur in a limited number of species [7, 8]. Lead accumulating species are rather exceptional. It was well established by Baker *et al.* [4] that *Thlaspi caerulescens* can accumulate Pb to high concentrations from nutrient solutions with low concentration of added Pb, mostly fixed in the root with limited translocation to the leaves. Few others species have

been described as Pb hyperaccumulators such as *Agrostis tenuis*, *Festuca ovina*, *Rumex acetosa* or *Thlaspi cepaeifolium* [9].

Concerning the molecular elements implicated in lead-tolerance mechanisms, the number of identified genes is quite small. The tobacco plasma membrane protein NtCBP4 and the Arabidopsis gene *CNGCI* were reported to be components of a transport pathway responsible for Pb entry into plant cells [10]. An Arabidopsis P-type ATPase, HMA3, was described to improve tolerance by sequestering Pb in the vacuole [11, 12]. HMA4, another P-type ATPase, from *Thlaspi caerulescens* has also been suggested as having a potential role in Pb efflux transport in yeast [13]. In Arabidopsis, three members of ABC (ATPase-binding cassette) transporters family AtATM3, AtPDR12 and AtPDR8 contribute to Pb resistance [1, 14, 15]. Recently, ACBP1, an acyl-CoA-binding protein, was found to be involved in mediating Pb tolerance through accumulation of Pb in shoots [16] and *AtMRP3* transcription was also shown to be strongly induced by Pb treatment [17] in *A. thaliana*. An important mechanism controlling heavy metal tolerance is chelation that involves small molecules such as metallothioneins, phytochelatins and glutathione [18, 19].

Here, we identified *Hirschfeldia incana*, a member of the *Brassicaceae* family, collected in abandoned lead mining sites in the east of Morocco, as a Pb accumulator plant and we demonstrated that this species, with a close genetic proximity to Arabidopsis, is a good experimental model to identify genes involved in lead tolerance and accumulation in higher plants.

Material and methods

Ethics statement

No specific permits were required for the described field studies because sample collection does not involve any endangered or protected plant species or privately-owned locations.

Plant material and growth conditions

Seeds of *H. incana* were harvested from plants growing in abandoned metalliferous mine spoils in the mine district of Oued El Himer, south of Oujda city in eastern Morocco (34°26'88"N, 1°54'03"W; Smouni *et al.*, 2010). Seeds were surface sterilized, sown on one half MS medium [20] with 1.2 % agar and grown vertically in a growth chamber at 22°C with a photoperiod of 16 h of light (0.1 mMol.m⁻².s⁻¹) from fluorescent lamps. After 2 weeks, seedlings were transferred to hydroponic culture on BD medium [21] and lead treatment was done by adding 50, 100 or 300 µM Pb(NO₃)₂ to a fresh BD medium without phosphate to avoid Pb precipitation. For the cultivation of *H. incana* on different soils with various lead concentrations, seedlings were grown on sterile compost for 20 days and transferred to four different soils from metalliferous mine spoils containing various amounts of lead (soil 1: 5000 mg.kg⁻¹ DW, soil 2: 12000 mg.kg⁻¹ DW, soil 3: 4500 mg.kg⁻¹ DW and soil 4: 1200 mg.kg⁻¹ DW).

Arabidopsis thaliana ecotype Columbia (Col-0) and T-DNA mutant seeds were obtained from the Nottingham Arabidopsis Stock Centre [22]. Seeds were surface-sterilized and sown on square Petri dishes containing BD medium without phosphate, with 1.2 % agar, with or without 40 µM Pb(NO₃)₂. After sowing on either standard or Pb-treated medium, seeds were cold treated at 4°C for 48 h in darkness to promote and synchronize germination, subsequently transferred in a vertical position to a growth chamber at 22°C with a photoperiod of 16 h of light (0.1 mMol.m⁻².s⁻¹). In hydroponic cultures, *A. thaliana* Col-0

seeds were prepared as described previously for *H. incana* seeds and seedlings were transferred after two weeks on liquid BD medium. The Pb-treatment was done by adding 40µM Pb(NO₃)₂ to a fresh BD medium without phosphate.

Lead quantification

Shoots or roots (three independent replicates per sample) were washed twice in cold 0.2 mM CaSO₄ and rinsed with cold distilled water. For the roots, rinsing with water and CaSO₄ does not remove adsorbed Pb, and hence all root tissue Pb measurements reported in this study include both the Pb taken up by the plant and the Pb adsorbed at the root surface. Samples were dried at 72°C for 48 h and a maximum of 200 mg of dried tissues were treated according to the acid hydrolysis protocol described by Temminghoff and Houba [23]. Soil samples were air-dried at 70°C to constant weight. Dried soils were sieved through a 1 mm mesh and ground in a porcelain pestle and mortar. From each prepared soil, 0.5 g (three replicates per sample) was treated as described by Smouni *et al.* [24]. Lead concentration was determined by ICP-AES (Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry; Ultima2 JY) in accordance with the method devised by Margui *et al.* [25].

DNA extraction

Hundred mg of fresh leaf tissue of *H. incana* were harvested directly in 500 µL of extraction buffer (100 mM TrisHCl, 500 mM NaCl, 50 mM EDTA, pH 8.0) and 70 µL of SDS 10 % (w/v) were added. Samples were homogenised, incubated 10 min at 65°C and 130 µL of 5M Potassium acetate were added. After homogenisation, samples were centrifuged 15 min at 13 000 rpm and 500 µL of the supernatant were added to 500 µL of propanol 2. The precipitated DNA was recovered by centrifugation 5 min at 13 000 rpm. The pellet was dry and

resuspended in 30 μ L of ultra pure water. DNA extraction was done on three independent replicate experiments.

RNA extraction

Total RNA was extracted from 100 mg of frozen samples, using the RNeasy Plant mini kit (Qiagen, USA) for roots and the SV Total RNA isolation system (Promega, USA) for shoots. All samples were DNase treated using the Turbo DNA-free (Ambion, USA) in accordance with the manufacturer's protocol. The RNA quality was confirmed by non denaturing electrophoresis. RNA extraction was done on three independent replicate experiments.

Quantitative real-time reverse-transcription PCR

First-strand synthesis was carried out using 1 μ g of total RNA with the reverse transcription system (Promega, USA) and oligo(dT)₂₀ primers. For the three biological replicates, two independent reverse transcriptions were done and pooled to minimize variation in reverse transcription yield. An equal amount of cDNA was used for each reaction, corresponding to 1.5 ng of total RNA. A reaction contained 7.5 μ L of Brilliant II Sybr Green QPCR master mix (Agilent, USA), 2.25 pmol of each primer in a total volume of 15 μ L. The reactions were done on the MX3005P apparatus (Agilent, USA) under the following thermal profile: 5 min at 95°C, 40 repeats of 10 s at 95°C, and 30 s at 60°C and a final stage to determine dissociation curves of 1 min at 95°C, 30 s at 55°C and after, constant temperature increasing to 95°C with the fluorescence reading in continuous. The primer set was designed with Primer 3 software and primers are listed in supplemental table S1. The efficiency of each primer pairs was determined by amplifying serial dilutions of cDNA. Tubulin gene was chosen as reference gene because there was less than 1 threshold cycle (Ct) difference among

the different samples and conditions. Relative expression ratios were calculated using the comparative ΔC_t method and efficiencies of each gene were taken into account. The calibration was done against roots or leaves from plants growing in standard conditions (without lead). The RNA level from the three biological samples was measured in triplicate.

Internal transcribed Spacer (ITS) sequence isolation

The complete ITS region (including ITS 1 and 2 and the 5.8 S r DNA gene) was amplified with the primers ITS4 and ITS5 [26]. PCR products of 722 bp were cloned into pGEM-T easy vector (Promega) and sequenced in the both sides with the universal M13 primers. Three ITS regions were sequenced from three PCR reactions done on the three independent DNA extractions. DNA sequences were aligned with the software Clustal. Percentage identity of the *H. incana* ITS consensus sequence and *A. thaliana* ITS sequence was determined with the software Blast.

H. incana gene cloning

PCR was achieved on roots or shoots of *H. incana* cDNA treated with 100 μ M Pb(NO₃)₂ for 3 days. Primers were designed directly from the literature or from *A. thaliana* sequences or by alignment of multiple sequences (Table S2). PCR fragments were purified with the Wizard SV PCR Clean up system (Promega) and ligated in the pGEM-T easy vector (Promega) before transforming *E. coli* competent cells. PCR products were sequenced by automated DNA sequencing (Eurofin MWG Operon) and gene identities were confirmed by comparison with the BLAST algorithm against the Genbank sequences.

Identification of Arabidopsis T-DNA insertion mutants

Multiple alignments of nucleotide sequences reveal high sequence identity with respectively HiHMA4 and At HMA4, and HiMT2a and AtMT2a. In addition, phylogenetic trees point to HiHMA4 and HiMT2a as putative orthologs of respectively AtHMA4 and AtMT2a (Figure S1). Consequently, homozygote plants of the T-DNA insertion lines Salk_093482 and Salk_059712 for the genes At2g19110 (*AtHMA4*) and At3g09390 (*AtMT2a*) respectively were identified by PCR using 3 different primers. In the case of Salk_093482, a T-DNA specific primer (LBb1, 5'-GCGTGGACCGCTTGCTCAACT-3') and two AtHMA4 specific primers (AtHMA4-F 5'-CACTTGACGGCGTTAAAGAA-3' and AtHMA4-R 5'-AACCATGACGCAAAACCACT-3') were used. In the case of Salk_059712, the same LBb1 T-DNA specific primer and two AtMT2a specific primers (AtMt-F 5'-CCATAACACACGGAACATCG-3' and AtMt-R 5'-AGATCCACATCCGCAGTTT-3') were used. The genotype of the F3 individuals was checked by PCR using gene-specific primers and T-DNA primers. Individual homozygous mutants were back-crossed twice with the wild-type Col-0.

Root growth analysis

Images of the root system were acquired using a desktop scanner (with a resolution of 450 dpi) directly from Arabidopsis plants growing in Petri dishes after 13 days of culture. Images were analyzed using Optimas software version 6.1 (Media Cybernetics, MD, USA). Data were exported to an Excel work-sheet for final processing.

Statistical analysis

All data are expressed as arithmetic means \pm SD of replicate plants within an experiment. All data shown are from one experiment representative of a total of two or three

independent biological experiments. All results were statistically analyzed using Statistica software version 7.1 (Statsoft, Tulsa, OK, USA). For the analysis of variance, 2-factors ANOVA with a LSD Post Hoc test were used to measure differences ($p < 0.01$).

Results

H. incana accumulates Pb in both leaves and roots

An exploration of the flora from mining sites in Oued El Himer region, located in the south of Oujda city (Oriental Morocco), was conducted in order to identify new species able to accumulate heavy metals in their shoots for a future phytoremediation project. The sites we studied have been heavily affected by lead mining and smelting activities, and soils are subjects of a polymetallic contamination [24]. In these areas, lead concentrations in soils varied from 26 to 9479 mg.kg⁻¹ [24]. Plants were collected and leaf samples were analyzed by ICP-AES in order to quantify heavy metal contents. The *Brassicaceae* *H. incana* was particularly interesting because of its accumulation profile of toxic heavy metals in leaf tissue (Figure1). In natural conditions, this species presented a high level of Pb in leaves ranging from 0.53 to 1.43 mg.g⁻¹ DW with an average of 0.79 mg.g⁻¹ DW (Figure 1). The other metals analyzed were present at lower concentration such as Cd or Zn with an average of 0.04 and 0.11 mg.g⁻¹ DW respectively even if the concentrations of these metals were high in the different sampled soils [24]. These results show that *H. incana* seems to be highly specific for Pb accumulation in accordance to the contents of the different heavy metals analyzed. In order to confirm the accumulator trait observed in natural conditions and to avoid air-borne contamination such as dust deposits, *H. incana* plants were grown under controlled growth chamber conditions on four different soils collected in metalliferous mine spoils. These soils contained various amounts of total Pb (soil 1: 5000 mg.kg⁻¹ DW; soil 2: 12000 mg.kg⁻¹ DW; soil 3: 4500 mg.kg⁻¹ DW; soil 4: 1200 mg.kg⁻¹ DW). After 2 months of culture, Pb content was quantified in the shoots (Figure 2). The concentration of Pb in leaves was variable from a minimum of 0.43 mg.g⁻¹ DW for plants grown on soil 1 to a maximum of 3.58 mg.g⁻¹ DW for those grown on soil 3. These results confirmed the lead hyperaccumulator trait for *H. incana*. On the other hand, no correlation was observed between Pb content in the different soils and

Pb level in the plant tissues suggesting variations in the amount of bioavailable lead. In the light of these results and according to the standard criteria on heavy metal hyperaccumulation (i.e. $> 0.1\%$ DW of Pb; [4, 8]), *H. incana* could be considered as a lead hyperaccumulator plant.

H. incana translocates Pb from roots to shoots

A four-day kinetic study, in hydroponic conditions, was achieved to confirm the transport of lead from roots to shoots in *H. incana* (Figure 3). Three Pb concentrations were tested (50, 100 and 300 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$). In the study period and with these concentrations of Pb, no visual damage could be observed neither in leaves and roots. The profiles of lead accumulation in roots or in shoots were similar for the different concentrations with a proportional response to the Pb concentration in the media. In hydroponic conditions, lead accumulation in roots and shoots were found to be dose and time dependent: roots showed more accumulation than shoots at the same concentration and exposure periods. In the shoots, a slow but constant increase of lead content after a latency period of 24 hours was observed for the three concentrations (Figure 3A). In the roots, the levels of Pb gradually increased with time of exposure for expected values of 42, 69 and 121 mg.g^{-1} DW for respectively 50, 100 and 300 μM of Pb in the media. A slight decrease of the curve was observed for the last points of kinetics for the 50 μM concentration and a plateau for the 100 μM concentration (Figure 3B).

In order to evaluate the distribution of Pb in different parts of the plant, *H. incana* was grown in hydroponic conditions supplied weekly with fresh media containing 100 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. After 2 months of Pb exposure, *H. incana* was able to accumulate up to 106 and 77 mg Pb.g^{-1} DW in roots at the vegetative stage and in roots at the floral stage respectively (Figure 4). The aerial plant organ with the highest Pb concentration was the rosette leaves reaching up to 0.95 mg.g^{-1} DW following by the siliques where the Pb content may reach 0.65

mg.g⁻¹ DW. These results confirm that the highest amount of lead accumulated in studied plants stays at the root level as described above but an important translocation of Pb can be observed from the roots to the leaves and even to the siliques.

Identification of genes involved in lead tolerance in H. incana

In order to characterize the molecular mechanisms involved in Pb tolerance and accumulation in *H. incana*, we identified *H. incana* homologues of several genes previously described in the literature as involved in heavy metal tolerance but not necessarily to Pb, such as *ATM3* (ATP-binding cassette transporter of mitochondrial protein), *CNGC1* (cyclic nucleotide-gated channel), *GS2* (glutathione synthetase), *HMA4* (heavy metal ATPase), *MRP3* (multidrug resistance-associated protein), *MT2a* (metallothionein) and *PCSI* (phytochelatin synthase). A tubulin (*TUB*) gene was identified and used as a reference gene for analysis of gene expression. Partial cDNA sequences were obtained by RT-PCR on leaves or roots total RNA from *H. incana* using primer sequences chosen in the literature or in consensus regions of the corresponding proteins from *A. thaliana* (Table S2). Identification of *H. incana* cDNA sequences was based on the analysis of deduced amino acid sequences, using the BLASTX program. This analysis revealed that all isolated cDNA sequences from *H. incana*, which contained one or more motifs characterizing the corresponding proteins, were highly similar to equivalent sequences from *A. thaliana* (Table 1). On the basis of these 8 genes, the percentage of sequence identities found between *H. incana* and *A. thaliana* was 89% in average with a maximum of 93% for the *PCSI* gene and a minimum of 84% for the *CNCG1* gene in the coding regions. The intergenic transcribed spacer (ITS) region from *H. incana* was cloned and sequenced. The percentage of identity in the ITS region between *H. incana* and *A. thaliana* was 85%. These results confirm the close genetic proximity between *H. incana* and *A. thaliana*.

The expression profile of the selected genes in response to Pb treatment was determined in *H. incana* and in the non tolerant *A. thaliana* (Figure 5). Seedlings previously grown on the standard medium were transferred to Pb medium (100 and 40 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ respectively for *H. incana* and *A. thaliana*) for a further 3 days. In roots of *H. incana*, an important increase of transcript levels (fold change > 2) associated to Pb-treatment was observed for five out of the seven target genes studied: *HiATM3*, *HiGS2*, *HiHMA4*, *HiMRP3* and *HiMT2a* but, among these, only *ATM3*, *GS2* and *HMA4* have a significant expression greater than that obtained in *A. thaliana* (Figure 5A). In leaves of *H. incana*, Pb treatment enhanced approximately by two-fold the expression of *HiHMA4* and more than eight-fold the expression of *HiMT2a* (Figure 5B). The expression of these genes was not significantly increased in Pb-treated plants of *A. thaliana*. These two genes, *HiHMA4* and *HiMT2a*, were particularly affected in both roots and leaves suggesting putative roles in lead tolerance and accumulation in *H. incana*.

If *HiHMA4* and *HiMT2a* are important for lead tolerance, as suggested by their overexpression in the presence of Pb, we expect the corresponding Arabidopsis T-DNA mutants to be more sensitive to heavy metals than wild type plants. To test the physiological function of HMA4 and MT2a in *A. thaliana*, two lines that contain T-DNA insertion in the *HMA4* gene (Salk_093482) and in the *MT2a* gene (Salk_059712) respectively were isolated from the T-DNA insertion collection generated at the Salk Institute (<http://signal.salk.edu/>). To evaluate the consequences of *HMA4* and *MT2a* gene disruption on root growth responses to Pb treatment, we examined the primary root length of mutant plants grown under Pb-treatment and control conditions and found them to be distinguishable from the wild type plants. Wild-type, *hma4* and *mt2a* seeds were germinated directly on standard media or on media with 40 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. The lead concentration used in this experiment corresponds to

the threshold of tolerance that *Arabidopsis* can withstand in our experimental conditions (data not shown). After 13 days of culture, Pb-treated wild-type plants did not seem to be affected by the Pb treatment compared to the control plants. Similarly when grown on standard medium, both *hma4* and *mt2a* mutants and wild-type plants showed a similar root phenotype. Pb treatment highly significantly reduced primary root length in both *hma4* (45%) and in *mt2a* (48%) mutants (Figure 6). This reduction in primary root growth reflects an increased sensitivity to Pb in the *Arabidopsis* T-DNA insertion mutants and it suggests that the *HMA4* and *MT2a* genes are involved in lead tolerance. We measured the Pb contents in roots and shoots of the 2 week-old wild-type and *hma4*- and *mt2a*-mutants (Figure 7). Roots of *hma4* plants contained 1.8-fold more Pb than those of the wild-type plants ($p<0.01$). Although the Pb content of *mt2a*-plants seems slightly higher than that of wild-type plants in $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ -containing media, the difference was not statistically significant. No effect was observed in Pb content in the shoots. The Pb accumulation observed in roots of *hma4* plants is compatible with an interruption of the translocation resulting from *HMA4* gene disruption.

Discussion

Unlike Zn and Cu which are essential micronutrients, Pb is non-essential and is detrimental to plant development. Its concentration through the food chain adversely affects biological functions of all living organisms [27]. The identification of genes associated with Pb tolerance and accumulation in plants is the first step towards their application in phytoremediation. Genes conferring Pb tolerance are rare [28] and rarer still are those that confer both Pb tolerance and Pb accumulation.

H. incana is a lead accumulator plant

High tolerance to heavy metals has evolved in a number of plant species leading to a class of rare plants named hyperaccumulators. In the case of Pb the number of plant species able to accumulate this heavy metal in any aboveground tissue in their natural habitat is surprisingly low with a poor degree of diversity [5, 9]. This fact may become an obstacle for the development of phytoremediation projects. The first implementation of phytoremediation strategies is the identification of plant species adapted to environmental conditions and able to accumulate large amount of at least one trace element. For Pb, the most common definition of a hyperaccumulator plant meets the following requirement: the concentration of metal in the shoot must be higher than 1 mg.g^{-1} DW of Pb [4, 8]. Considering this definition, our data obtained from plants collected in tailing mine areas have shown that *H. incana* is a Pb hyperaccumulator (Figure 1). *H. incana* was previously described to accumulate Cu [29], Tl [30] and Zn [31]. Nevertheless, on the polluted site we studied, *H. incana* seems to accumulate preferentially Pb even if Cd, Cu and Zn are present in large amounts in the soil (Figure 1; [24]. The absence of pronounced accumulation of other heavy metals by *H. incana* may be due to competitive interactions between metal ions in these multi-contaminated soils,

inhibiting uptake of heavy metals, relative to media having elevated levels of single metals [31, 32]. In controlled growth conditions on different Pb contaminated soils with no possibility of air-borne contaminations, *H. incana* could accumulate concentration until 3.58 mg.g⁻¹ DW of Pb in the aboveground part (Figure 2), confirming the hyperaccumulator trait of *H. incana*. Hydroponic cultures using the bioavailable Pb(NO₃)₂ in phosphate free medium is an interesting way to estimate Pb accumulation in both roots and leaves in order to confirm Pb translocation from root to leaves (Figure 3). The amount of lead in leaves after 4 days in hydroponic culture with medium containing 300 µM of Pb(NO₃)₂ reaches 0.4 mg.g⁻¹ DW. With a longer Pb-exposition, we find lead not only in the stems, the rosette and the stem leaves but also in the siliques (Figure 4). Large differences of lead concentration between root and leaf may indicate an important restriction of the internal transport of this metal from the roots towards the stem, leaves and siliques. However our results rather showed that, although *H. incana* accumulated high concentrations of Pb in the shoots (> 1mg.g⁻¹ DW of Pb), Pb was mainly stored but not immobilized in its roots. Highest concentrations of Pb in roots than in shoots seem to be a general pattern of lead distribution in plants [27, 33, 34]. Taken together, these different experiments demonstrate that *H. incana* could be classified as Pb accumulator species because it tolerates by far more than 1 mg.g⁻¹ DW of Pb in the shoots. However the second criteria defining a hyperaccumulating species, which consists in a higher concentration of the considered heavy metal in the shoots than in the roots, was not fulfilled in *H. incana*. Nevertheless this species implements all the mechanisms that are necessary to translocate Pb from the roots to the aerial parts of the plant and accumulate Pb in different organs.

H. incana is a powerful tool to identify genes involved in Pb tolerance and accumulation

Several genes previously described in the literature as being involved in heavy metal tolerance and accumulation were selected in order to measure their expression pattern in Pb-

treated plants compared to control plants from *H. incana* and *A. thaliana* (Figure 5). Thus among these genes, ATM3 is a mitochondrial transporter that is essential for Fe homeostasis in *A. thaliana* [35] but Kim *et al.* [14] provided several lines of evidence to implicate ATM3 in heavy metal resistance. They showed that the expression of *ATM3* gene is induced either by Cd or Pb and demonstrated that *ATM3*-overexpressing plants grow better than wild-type plants on either Cd- or Pb-containing medium. The activity of *MRP3* promoter from *A. thaliana*, a gene encoding an ABC-transporter, is induced by As, Cd, Cu, Ni, and Pb, but not by Zn and Fe [17]. Disruption by T-DNA insertion mutagenesis of the Arabidopsis gene *CNGC1* conferred plant tolerance to Pb [11]. HMA4 is a Zn/Cd transporter that presented plant tolerance to Cd by loading it into the xylem, thus increasing translocation to the shoot where it might have less damaging effects [13, 36, 37]. Enhanced expression of *HMA4* gene has been shown to be essential for Cd tolerance in Cd-accumulator *A. halleri* [38]. Yeast functional complementation assays revealed that the expression of *MT1a*, *MT2a* and *MT3a* genes in Arabidopsis could increase the tolerance of yeast mutants to Cu and Cd [39, 40, 41]. However, with regard to Pb, little is known about the relationship between the induction of plant MT genes and lead tolerance [42, 43, 44]. It is also the same for phytochelatin that were identified as heavy-metal-binding peptides involved in the accumulation, detoxification and metabolism of metal ions (for review [18]). But an alternative to phytochelatin could be glutathione that can also bind lead [19].

In our experiments, gene expression profiles in *H. incana* showed a significant up-regulation (FC>2) by Pb-treatment for some genes such as *HiATM3*, *HiGS2*, *HiHMA4*, *HiMRP3* and *HiMT2a* in roots (Figure 5A) and *HiHMA4* and *HiMT2a* in aerial parts (Figure 5B). The analysis of the expression of these genes in *A. thaliana*, a non Pb tolerant species, showed that only *ATM3*, *GS2* and *HMA4* were specifically over-expressed in roots and only *HMA4* and *MT2a* were specifically over-expressed in shoots by Pb-treatment in *H*

incana (Figure 5). In agreement with previous report, an overexpression of *ATM3* was observed in *H. incana* roots by Pb treatment [14]. The fact that gene expression was up-regulated for *HiGS2* but not for *HiPCSI* seems to confirm the hypothetical role of glutathione in the chelating of Pb instead of phytochelatins [19]. Moreover this result can be correlated with the up-regulation of *HiATM3* which is coding a mitochondrial ABC transporter of metal putatively conjugated with glutathione [14].

From this expression profiling experiment (Fig 5), two genes, *HMA4* and *MT2a*, retained our attention because they were both specifically over-expressed in roots and/or shoots of *H. incana* compared to *A. thaliana*. The expression of *HiHMA4* and *HiMT2a* was induced two-fold and eight-fold respectively by Pb-exposure in the leaves as well as five-fold and three-fold respectively in the roots. In previous reports *HMA4* gene expression was shown to be modulated by Cd, Mn and Zn treatments [45, 46], and, in the present work, by Pb treatment. The involvement of *HiHMA4* and *HiMT2a* genes in the tolerance process was indirectly studied using T-DNA insertional mutants from Arabidopsis. Two *A. thaliana* mutant lines for respectively *HMA4* and *MT2a* genes were isolated and compared with Col0 wild-type for root growth and Pb content. A significant primary root length decrease was observed under Pb-treatment for both mutant lines, which conformed the implication of these two genes in lead tolerance mechanisms in *A. thaliana* (Figure 6). Similar approaches were used for the *Athma4* mutant in presence of Zn, Cd and Co but no significant phenotype was found [36, 47] whilst in our case *AtHMA4* confers resistance to Pb. In parallel a significant increase of Pb content was observed in the roots and a slight but not significant decrease in shoots of *Athma4* mutants under Pb-treatment (Figure 7). This result can be interpreted as the blocking of translocation leading to an accumulation of Pb in roots and a reduction in shoots. This hypothesis is in concordance with the role of *HMA4* in cytosolic metal efflux [6, 13, 48]. In the Cd/Zn hyperaccumulators, *A. halleri* and *N. caerulescens*, *HMA4* would be involved in

the detoxification of roots by translocated Cd or Zn to the shoots [13, 6]. HMA4 seems to be implicated in lead accumulation in *H. incana* by functioning as metal xylem loading.

For the *MT2a* gene both the up-regulation of the expression by lead exposure in *H. incana* and the phenotype of *A. thaliana mt2a* mutant under Pb-treatment confirmed, for the first time, the implication of a metallothionein in lead tolerance. Several lines of evidence suggest that, as in mammals, plant metallothioneins are involved in the response to oxidative stress and metal toxicity as well as in the regulation of metal homeostasis [49, 50, 51]. In *Festuca rubra*, functional complementation studies using yeast mutant confirmed the functional implication of *MT1* gene in sequestering both essential (Cu, Zn) and non-essential metals (Cd, Pb, Cr) [52]. Recently it was demonstrated that the expression of *AtMT2a* was induced under H₂O₂ and low temperature stresses, and *AtMT2a* functions as an ROS scavenger in the cytosol under abiotic stress conditions [53]. A similar role of *MT2a* in response to lead exposure can also be suggested.

Taken together, our results demonstrated that *H. incana* is an interesting experimental model to identify new genes involved in the molecular mechanisms of Pb accumulation and tolerance in plants. Indeed its close genetic proximity to *A. thaliana* allows the use of its powerful genetic resources: complete sequencing and annotated genome to identify target genes, T-DNA insertion mutants for functional analysis of these genes.

Acknowledgements

Abdelaziz Smouni gratefully acknowledges the support from IRD through a BESCD grant. We are thankful to Sophia El Hassouni for technical assistance and Pr Mohamed Ater (Laboratoire Diversité et Conservation des Systèmes Biologiques, Faculté des Sciences de Tétouan, Morocco) for his help and advice in the field.

References

1. Lee M, Lee K, Lee J, Noh EW, Lee Y (2005) AtPDR12 contributes to lead resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 138: 827-836.
2. Sharma P, Dubey RS (2005) Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17: 35-52.
3. Van Nevel L, Mertens J, Oorts K, Verheyen K (2007) Phytoextraction of metals from soils: How far from practice? *Environmental Pollution* 150: 34-40.
4. Baker AJM, Reeves RD, Hajar ASM (1994) Heavy metal accumulation and tolerance in British populations of the metallophyte *Thlaspi caerulescens* J. & C. Presl (Brassicaceae). *New Phytologist* 127: 61-68.
5. Kramer U (2010) Metal hyperaccumulation in plants. *Annual Review of Plant Biology* 61: 517-534.
6. Verbruggen N, Hermans C, Schat H (2009) Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist* 181: 759-776.
7. Anderson CWN, Brooks RR, Chiarucci A, LaCoste CJ, Leblanc M, et al. (1999) Phytomining for nickel, thallium and gold. *Journal of Geochemical Exploration* 67: 407-415.
8. Baker AJM, Brooks RR (1989) Terrestrial higher plants which hyper-accumulate metallic elements - A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* 1: 81-126.
9. Reeves RD (2006) Hyperaccumulation of trace elements by plants. In: Morel JL, Echevarria G, Goncharova N, editors. *Phytoremediation of Metal-contaminated Soils*. NATO Sciences Series 68. Springer, New York. pp. 25-52.
10. Sunkar R, Kaplan B, Bouche N, Arazi T, Dolev D, et al. (2000) Expression of a truncated tobacco NtCBP4 channel in transgenic plants and disruption of the homologous

- Arabidopsis CNGC1 gene confer Pb tolerance. Plant Journal 24: 533-542.
11. Gravot A, Lieutaud A, Verret F, Auroy P, Vavasseur A, et al. (2004) AtHMA3, a plant P_{1B}-ATPase, functions as a Cd/Pb transporter in yeast. FEBS Letters 561: 22-28.
 12. Morel M, Crouzet J, Gravot A, Auroy P, Leonhardt N, et al. (2009) AtHMA3, a P_{1B}-ATPase allowing Cd/Zn/Co/Pb vacuolar storage in Arabidopsis. Plant Physiology 149: 894-904.
 13. Papoyan A, Kochian V (2004) Identification of *Thlaspi caerulescens* genes that may be involved in heavy metal hyperaccumulation and tolerance. Characterization of a novel heavy metal transporting ATPase. Plant Physiology 145: 3814-3823.
 14. Kim DY, Bovet L, Kushnir S, Noh EW, Martinoia E, et al. (2006) AtATM3 is involved in heavy metal resistance in Arabidopsis. Plant Physiology 140: 922-932.
 15. Kim DY, Bovet L, Maeshima M, Martinoia E, Lee Y (2007) The ABC transporter AtPDR8 is a cadmium extrusion pump conferring heavy metal resistance. Plant Journal 50: 207-218.
 16. Xiao S, Gao W, Chen QF, Ramalingam S, Chye ML (2008) Overexpression of membrane-associated acyl-CoA-binding protein ACBP1 enhances lead tolerance in Arabidopsis. The Plant Journal 54: 141–151.
 17. Zientara K, Wawrzynska A, Lukomska J, Lopez-Moya JR, Liszewska F, et al. (2009) Activity of the AtMRP3 promoter in transgenic *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum* plants is increased by cadmium, nickel, arsenic, cobalt and lead but not by zinc and iron. Journal of Biotechnology 139: 258-263.
 18. Cobbett C, Goldsbrough P (2002). Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. Annual review of Plant Biology 53: 159-182.
 19. Gupta DK, Huang HG, Yang XE, Razafindrabe BH, Inouhe M (2010). The detoxification of lead in *Sedum alfredii* H. is not related to phytochelatins but the glutathione. Journal of

Hazardous Materials 177: 437-444.

20. Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
21. Broughton WJ, Dilworth MJ (1971) Control of Leghaemoglobin synthesis in snake beans. *Biochemical journal* 125: 1075-1080.
22. Scholl RL, May ST, Ware DH (2000) Seed and molecular resources for Arabidopsis. *Plant Physiology* 124: 1477-1480.
23. Temminghoff EJM, Houba VJG (2004) Digestion with HNO₃-H₂O₂-HF. In: Temminghoff EJM, Houba VJG, editors. *Plant Analysis Procedures* (second edition). Kluwer, Dordrecht. pp. 16-19.
24. Smouni A, Ater M, Auguy F, Laplaze L, El Mzibri M, et al. (2010) Assessment of contamination by metallic trace elements in a mining area of eastern Morocco. *Cahiers Agriculture* 19:, 26-76.
25. Marguí E, Queralt I, Carvalho ML, Hidalgo M (2005) Comparison of EDXRF and ICP-OES after microwave digestion for element determination in plant specimens from an abandoned mining area. *Analytica Chimica Acta* 549: 197-204.
26. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. *PCR protocols. A guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, Calif. pp. 315-322.
27. Pourrut B, Shahid M, Dumat C, Winterton P, et al. (2011) Lead uptake, toxicity, and detoxification in plants. In: Whitacre DM, editor. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 213. Springer, New York. pp. 113-136.
28. Xiao S, Chye ML (2008) Arabidopsis ACBP1 overexpressors are Pb(II)-tolerant and accumulate Pb(II). *Plant Signaling & Behavior* 3: 693-94.

29. Poschenrieder P, Bech J, Llugany M, Pace A, Fenés E, et al. (2001) Copper in plant species in a copper gradient in Catalonia (North East Spain) and their potential for phytoremediation. *Plant and Soil* 2: 247-256.
31. Gisbert C, Clemente R, Navarro-Aviñó J, Baixauli C, Ginér A, et al. (2006) Tolerance and accumulation of heavy metals by Brassicaceae species grown in contaminated soils from Mediterranean regions of Spain. *Environmental and Experimental Botany* 56: 19-27
32. Walker DJ, Bernal MP (2004) The effects of copper and lead on growth and zinc accumulation of *Thlaspi caerulescens* J. and C. presl: implications for phytoremediation of contaminated soils. *Water Air Soil Pollution* 151: 361-372.
33. Yanqun Z, Yuan L, Schvartz C, Langlade L, Fan L (2004) Accumulation of Pb, Cd, Cu and Zn in plants and hyperaccumulator choice in Lanping lead–zinc mine area, China. *Environment International* 30: 567-576.
34. Deng DM, Deng JC, Li JT, Zhang J, Hu M, et al. (2008) Accumulation of zinc, cadmium, and lead in four populations of *Sedum alfredii* growing on lead/zinc mine spoils. *Journal of Integrative Plant Biology* 50: 691-698.
35. Kushnir S, Babiychuk E, Storozhenko S, Davey MW, Papenbrock J, et al. (2001) A mutation of the mitochondrial ABC transporter Stal1 leads to dwarfism and chlorosis in the *Arabidopsis* mutant starik. *Plant Cell* 13: 89-100.
35. Madejón P, Murillo JM, Marañón T, Lepp NW (2007) Factors affecting accumulation of thallium and other trace elements in two wild Brassicaceae spontaneously growing on soils contaminated by tailings dam waste. *Chemosphere* 67: 20-28.
36. Verret F, Gravot A, Auroy P, Leonhardt N, David P, et al. (2004) Overexpression of AtHMA4 enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant metal tolerance. *FEBS Letters* 576: 306-312.
37. Mills RF, Francini A, Ferreira da Rocha PS, Baccarini PJ, Aylett M, et al. (2005) The

- plant P_{1B}-type ATPase AtHMA4 transports Zn and Cd and plays a role in detoxification of transition metals supplied at elevated levels. FEBS Letters 579: 783-791.
38. Hanikenne M, Talke IN, Haydon MJ, Lanz C, Nolte A, et al. (2008) Evolution of metal hyperaccumulation required cis-regulatory changes and triplication of HMA4. Nature 453: 391-395.
39. Roosens NH, Bernard C, Leplae R (2004) Evidence for copper homeostasis function of metallothionein (MT3) in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. FEBS Letters 577: 9-16.
40. Lee J, Shim D, Song WY, Hwang I, Lee Y (2004) Arabidopsis metallothioneins 2a and 3 enhance resistance to cadmium when expressed in *Vicia faba* guard cells. Plant Molecular Biology 54: 805-815.
41. Guo WJ, Meetam M, Goldsbrough PB (2008) Examining the specific contributions of individual Arabidopsis Metallothioneins to copper distribution and metal tolerance. Plant Physiology 146: 1697–1706.
42. Yu LH, Umeda M, Liu JY, Zhao NM, Uchimiya H (1998) A novel MT gene of rice plants is strongly expressed in the node portion of the stem. Gene 206: 29-35.
43. Xu YF, Zhou GK, Zhou L, Li YQ, Liu JY (2007) Expression patterns of the rice class I metallothionein gene family in response to lead stress in rice seedlings and functional complementation of its members in lead-sensitive yeast cells. Chinese Science Bulletin 52: 2203-2209.
44. Dong CJ, Wang Y, Yu SS, Liu JY (2010) Characterization of a novel rice metallothionein gene promoter: its tissue specificity and heavy metal responsiveness. Journal of Integrative Plant Biology 52: 914-924.
45. Mills RF, Krijger GC, Baccarini PJ, Hall JL, Williams LE (2003) Functional expression of AtHMA4, a P-1B-type ATPase of the Zn/Co/Cd/Pb subclass. Plant Journal 35: 164-176.

46. Bernard C, Roosens N, Czernic P, Lebrun M, Verbruggen N (2004) A novel CPx-ATPase from the cadmium accumulator *Thlaspi caerulescens*. FEBS letters 569: 140-148.
47. Hussain D, Haydon MJ, Wang Y, Wong E, Sherson SM, et al. (2004) P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in Arabidopsis. Plant Cell 16: 1327-1339.
48. Wong CKE, Cobbett C (2009) HMA P-type ATPases are the major mechanism for root-to-shoot Cd translocation in Arabidopsis. New Phytologist 181: 71-78.
49. Murphy A, Taiz L (1995) Comparison of metallothionein gene expression and nonprotein thiols in ten Arabidopsis ecotypes (correlation with copper tolerance). Plant Physiology 109: 945-954.
50. Jin S, Cheng Y, Guan Q, Liu D, Takano T, et al. (2006) A metallothionein-like protein of rice (rgMT) functions in *E. coli* and its gene expression is induced by abiotic stresses. Biotechnology Letters 28: 1749-1753.
51. Huang GY, Wang YS (2009) Expression analysis of type 2 metallothionein gene in mangrove species (*Bruguiera gymnorhiza*) under heavy metal stress. Chemosphere 77: 1026-1029.
52. Ma M, Lau PS, Jia YT, Tsang WK, Lam SKS, et al. (2003) The isolation and characterization of Type 1 metallothionein (MT) DNA from a heavy-metal-tolerant plant, *Festuca rubra* cv. Merlin. Plant Science 164: 51-60.
53. Zhu W, Zhao D-X, Miao Q, Xue T-T, Li X-Z, et al. (2009) Arabidopsis thaliana metallothionein, AtMT2a, mediates ROS balance during oxidative stress. Journal of Plant Biology 52: 585-592.
54. Dong R, Formentin E, Losseso C, Carimi F, Benedetti P, et al. (2005) Molecular cloning and characterization of a phytochelatin synthase gene, PvPCS1, from *Pteris vittata* L. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 32: 527- 533

Figures

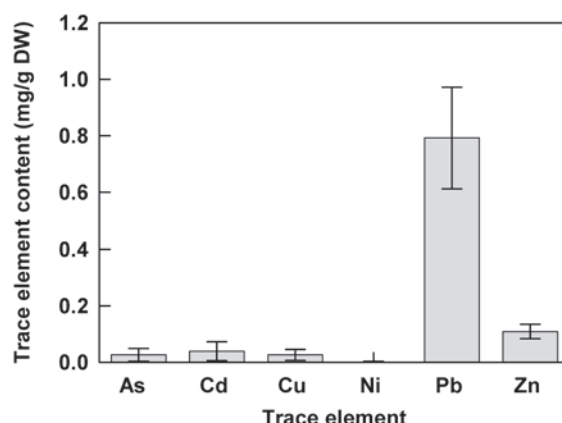


Figure 1. Amount of metallic trace elements (As, Cd, Cu, Ni, Pb and Zn) in shoots of *H. incana*. Plants were collected from different zones in a heavy metal polluted area. Data are the average (\pm SE) of six independent measurements.

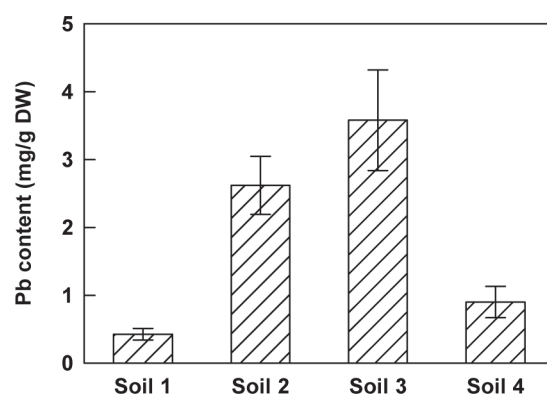


Figure 2. Lead concentration in shoots of *H. incana* growing on different polluted soils. Seedlings were grown on sterile compost for 20 days and transferred for 2 months on 4 different soils containing various amounts of total lead (soil 1: 5000 mg.kg⁻¹ DW; soil 2: 12000 mg.kg⁻¹ DW; soil 3: 4500 mg.kg⁻¹ DW; soil 4: 1200 mg.kg⁻¹ DW). Data are the average (\pm SE) of three independent measurements.

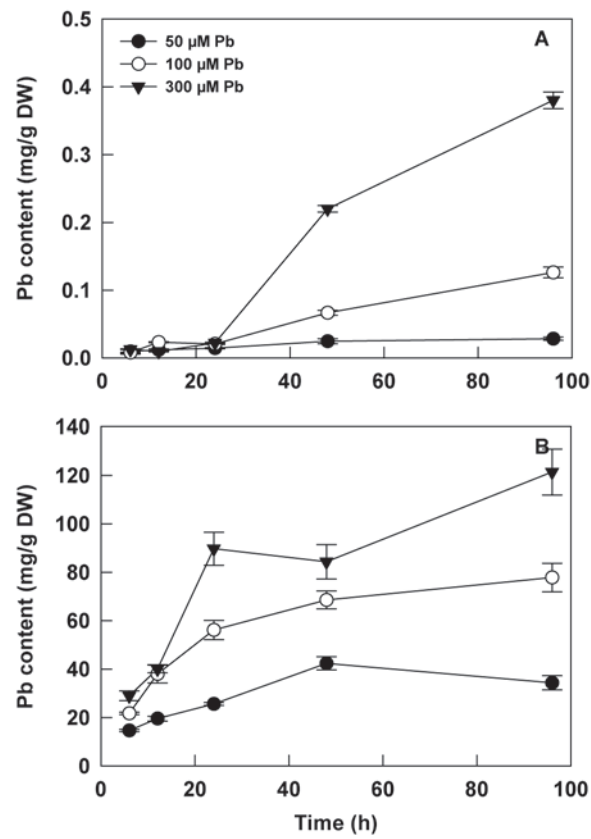


Figure 3. Kinetic effect of lead exposure on lead accumulation in (A) shoots and (B) roots of *H. incana*. Seedlings were grown on hydroponic system and lead treatments were done after 2 weeks by adding 50, 100 and 300 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ in fresh medium. Data are the average (\pm SE) of three independent measurements.

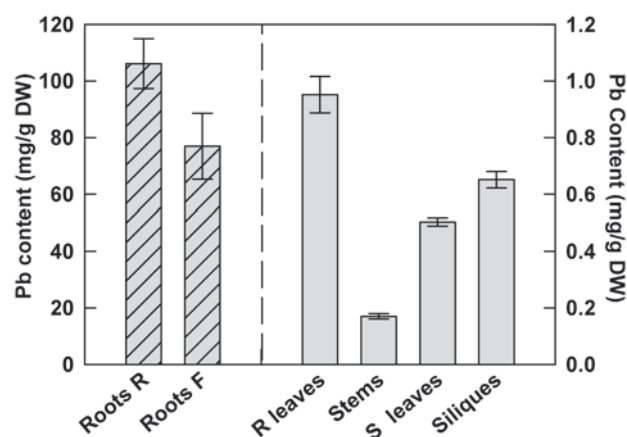


Figure 4. Lead distribution in different parts of *H. incana*.

Seedlings were grown for 2 months in hydroponic conditions supplied weekly with fresh media containing 100 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. Roots R = roots at the rosette stage; Roots F = roots at the floral stage; R leaves = rosette leaves; S leaves = stem leaves. Data are the average (\pm SE) of three independent measurements.

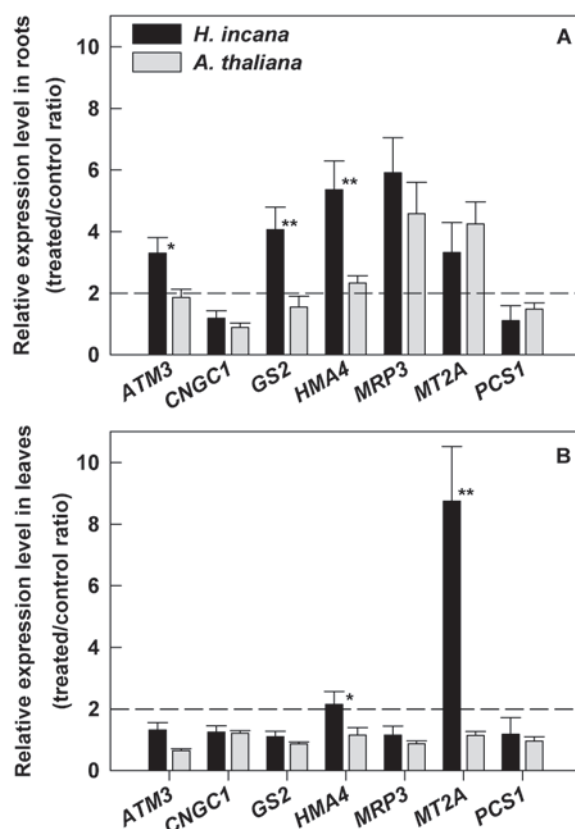


Figure 5. Quantitative analysis of the expression levels of *ATM3*, *CNGC1*, *GS2*, *HMA4*, *MRP3*, *MT2a* and *PCS1* genes.

Expression profiles were obtained from (A) roots and (B) leaves of *H. incana* and *A. thaliana*, Pb-treated or not for 3 days. The tubulin gene was use as reference gene and the calibration was done against the roots or the leaves of plants cultivated without Pb. Data are expressed as relative expression level (treated/control ratio) and are the average (\pm SE) of three independent replicates composed by nine seedlings. * and **, Significant difference of values at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively, by Student's t-test in comparison between *H. incana* and *A. thaliana*. Dashed line indicates a fold change of 2.

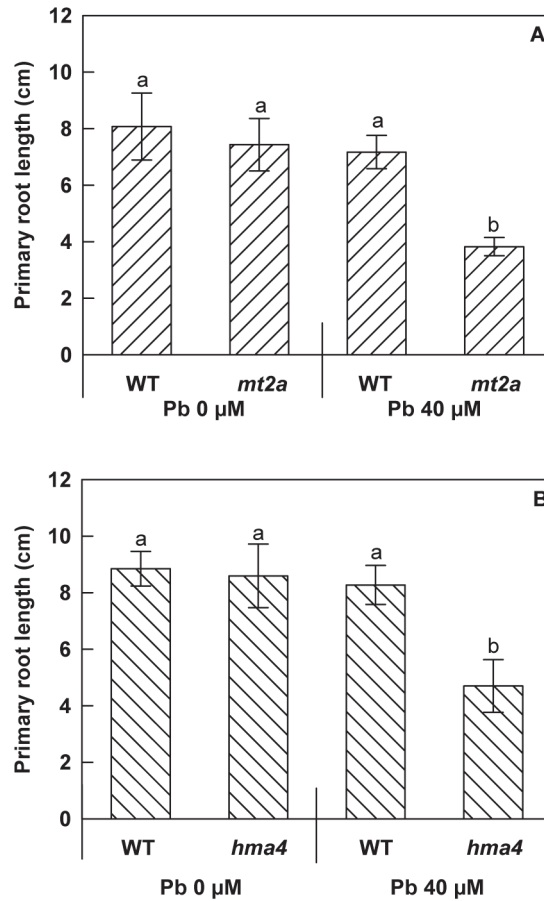


Figure 6. Effects of lead treatment on primary root length in wild-type and knockout mutant seedlings of *A. thaliana*.

Seedlings were grown for 13 days on vertically orientated agar plates with or without 40 μM of $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. (A) *Atmt2a* T-DNA mutant analysis. (B) *Athma4* T-DNA mutant analysis. All results are the average value (\pm SE) of 16 seedlings. The letters represent statistically homogenous subgroups using LSD post hoc test at a $\alpha = 0.01$ significance level.

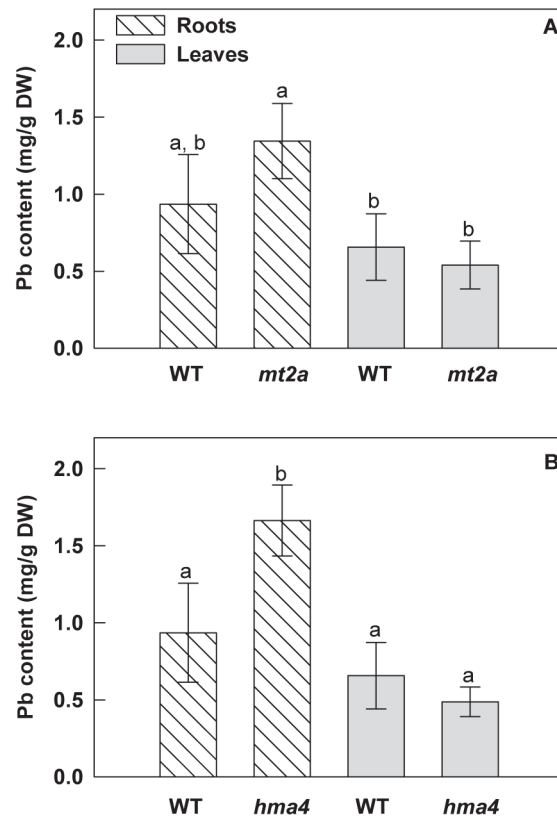


Figure 7. Lead accumulation in roots and shoots of wild-type and knockout mutant seedlings of *A. thaliana*.

Seedlings were collected after 13 days of culture on agar plates with or without 40 μ M of $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. (A) *Atmt2a* T-DNA mutant analysis. (B) *Athma4* T-DNA mutant analysis. All results are the average value (\pm SE) of three independent replicates. For the roots and leaves separately, the letters represent statistically homogenous subgroups using LSD post hoc test at a $\alpha = 0.01$ significance level.

Table 1. Description of the cDNA sequences isolated from *H. incana*

Gene name	Length (bp)	Accession ^a	Similarity to <i>A. thaliana</i> ^b
<i>HiATM3</i>	407	HQ398196.1	91 % to At5g58270
<i>HiCNGC1</i>	866	HQ398199.1	84 % to At5g53130
<i>HiGS2</i>	531	HQ398198.1	88 % to At5g27380
<i>HiHMA4</i>	863	HQ398195.1	86 % to At2g19110
<i>HiMRP3</i>	633	HQ398194.1	89 % to At3g13080
<i>HiMT2a</i>	184	HQ398197.1	88 % to At3g09390
<i>HiPCS1</i>	118	JF288760.1	93 % to At5g44070
<i>HiTUB</i>	1066	HQ398200.1	92 % to At1g50010

^a GeneBank accession number (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

^b AGI gene code (<http://www.arabidopsis.org/>).

Supporting informations

Table S1: list of the specific primer pairs for quantitative real-time reverse-transcription PCR

Primer Name	Forward primer sequence	Reverse primer sequence
At_QATM3	CAGCACAACAGAGGCAGAGA	CACCTTCCCGTTTCCAGTA
At_QCNGC1	TCACAACAAACGGTGGGAAGA	TTGGGAGGTTTGAGGATGAG
At_QGS2	CAAGCAGTCGCAGTGGTTTA	GCCAGTTCTTGCTGGATTTT
At_QHMA4	CACACAGAGCCGTCAAGGTA	TGCATAACTCCTGCAACAGC
At_QMRP3	GTGTTCCCAAGTGAACACCT	CTCGCAACACAAGAGGCATA
At_QMT	TCTCCGGCGAGACAACCACAA	TTCTCAGCGTTGTTACTCTCCCCT
At_QPCS1	CGTCAAATGCACGAGTTCTG	GAGGGGGATACTTGAAACG
At_QTUB	ATCCACTTCATGCTTTCCTC	GGTAGTTGATTCCACACTTGAA
Hi_QATM3	GTGTGACGAGGCAACAAGTG	CACCTTCCCGTTTCTCCAGTA
Hi_QCNGC1	ACAAACGGTGGGAAGAACAGG	AACGTATGCCTCAGCTGCTT
Hi_QGS2	CAAGCAGTCGCAGTGGTTTA	GCGAGTTCTTGCTGGATTTT
Hi_QHMA4	CCTCATCTACTTCAACTTCTTCTC	GCAGCAGTCGTGTTCTTATTC
Hi_QMRP3	TTCAAGGGTGGGAGATGAAG	CAAGTGGGATGCCAAGAAGT
Hi_QMT	ACTGGTAATGATTCGTTGATG	AGCCTCGTACTGCTGGTTCTTC
Hi_QPCS1	GTATCACAGAGGGGTGTTTA	GAGGGGGATACTTGAAACG
Hi_QTUB	ATCCACTTCATGCTTTCCTC	GGTAGTTGATACCGCACTTGAA

Sequences are listed 5'-3'

Table S2: list of the specific primer pairs used for cloning *H. incana* genes

Primer name	Forward primer sequence	Reverse primer sequence	Primer origin
ATM3	GCTCGGCGTGCTGCAATTCATG	GCTGCATCAAGCATATCCAC	Modified from Kim <i>et al.</i> , 2006[14]
CNGC1	GAAGAGACGCAGAACAAATGG	CTGGCTCTGCTGGTTTCTGA	Sunkar <i>et al.</i> , 2000[10]
GS2	CAAGCAGTCGCAGTGGTTTA	TTCGTCTTTGCTCCTGAGGT	Designed from Arabidopsis
HMA4	AGGTTAGAAGCAAACGTGA	GGTGTAGAGAGGATAAGACC	Designed from sequence alignment
MRP3	CAAGGACGCACAAGTGGGGAG	TGTAGAATCCTGAAGGTTGC	Designed from sequence alignment
MT	GCATGTGGTTGTGGATCTGG	CACTTGCATTGCATCGTTCTC	Designed from Arabidopsis
PCS1	TGGAGGTGGTTCGATGAATCAATG	GGGATACTTGAAACGAGCAACATC	Dong <i>et al.</i> , 2005 [54]
TUB	GAGTGCATCTCGATCCACAT	GGTAGTTGATACCGCACTTGAA	Designed from Arabidopsis

Sequences are listed 5'-3'

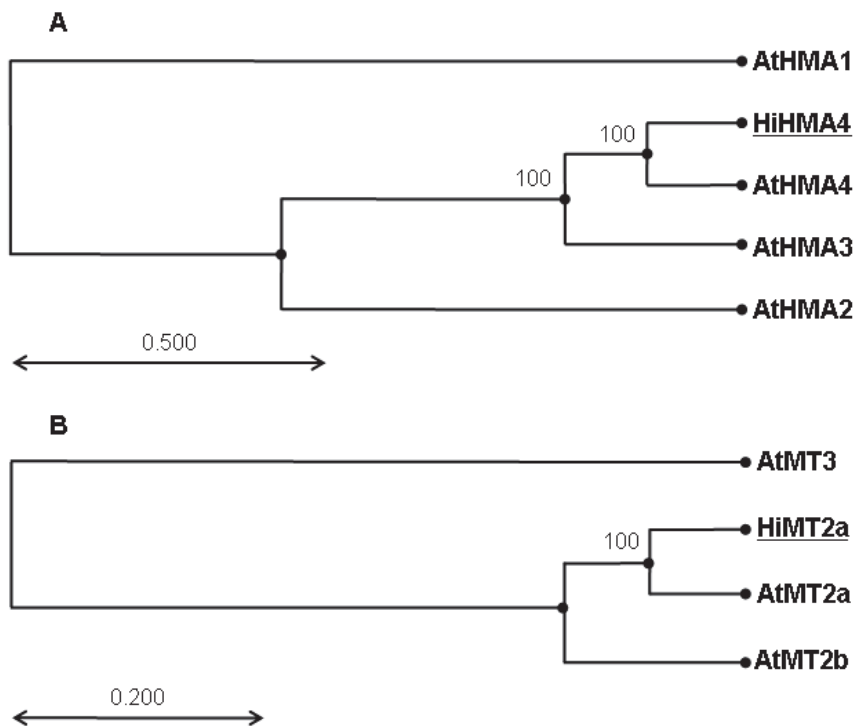


Figure S1: Phylogenetic tree, based on the unweighted pair group method with arithmetic mean, showing the relationships (A) between HiHMA1, AtHMA1 (AT4G37270), AtHAM2 (AT4G30110), AtHMA3 (AT4G30120) and AtHMA4 (AT2G19110), (B) between HiMT2a, AtMT2a (AT3G09390), AtMT2b (AT5G02380), AtMT3 (AT3G15353). Bootstrap values are indicated in percentage (100 replicates).

Multiple sequence alignments were made from the coding DNA sequence using Clustal software.

Chapitre 4

Identification de gènes

impliqués dans

la tolérance au Pb

1-) Introduction

Depuis quelques années, une nouvelle stratégie est utilisée pour identifier des gènes impliqués dans la tolérance aux ETMs. Il s'agit de l'hybridation croisée entre espèces (CSH « Cross Species Hybridisation ») que l'on peut appliquer aux puces à ADN.

La CSH consiste à hybrider des ARN d'une espèce différente de celle dont les sondes ont été déposées sur la puce à ADN. La CSH s'est développée ces dix dernières années car il n'était pas possible, principalement à cause du coût, de développer une puce pour chaque plante d'intérêt alors qu'il en existait déjà pour les plantes modèles telles que, par exemple, *Oriza sativa* ou *Arabidopsis thaliana*. Cette technique peut s'appliquer avec succès à des espèces ayant divergé depuis moins de 10 millions d'années (Bar-Or *et al.*, 2007).

En utilisant cette méthode, un certain nombre d'ARN de la plante d'intérêt ne va pas s'hybrider avec la puce parce que leurs séquences seront trop divergentes mais les ARN qui vont s'hybrider permettront de mettre en évidence des gènes différentiellement exprimés. Les CSH vont servir à comparer 2 espèces ayant des caractères contrastés (par exemple, une plante tolérante à un ETM et une autre sensible) mais aussi à comparer différents tissus, stades ou conditions chez une espèce qui ne dispose pas de puce spécifique (Van de Mortel & Aarts, 2006).

Concernant l'étude de la tolérance et de l'accumulation des ETMs, la CSH a été utilisée pour comparer *A. halleri* et/ou *N. caerulescens* à la plante modèle *A. thaliana*.

Arabidopsis halleri et *A. thaliana* sont des espèces très proches qui auraient divergé, il y a 5,8 millions d'années (Roosens *et al.*, 2008). Elles montrent 94% d'identité dans les régions codantes. Deux études utilisant la CSH ont été menées en hybridant des ARN d'*A. halleri* traités avec du Cd (Weber *et al.*, 2006) ou du Zn (Becher *et al.*, 2004) sur des puces de type Affymetrix. Weber *et al.* (2006) a pu mettre en évidence 23 gènes dont l'expression est induite par un apport de Cd dans le milieu de culture et, parmi ces 23 gènes, 5 ne seraient régulés chez les deux espèces que par le Cd dont un seul spécifiquement chez *A. halleri*. Il s'agit d'un gène, *MYB15*, codant un facteur de transcription de la famille des MYB. Concernant l'étude de Becher *et al.* (2004), 10 gènes ont pu être identifiés comme étant induits par une forte concentration en Zn par rapport à *A. thaliana* et, parmi ceux-ci, un gène, *HMA3*, codant pour une ATPase de type P_{1B}, un gène, *ZAT*, codant pour une protéine facilitatrice de la diffusion des cations et un gène, *ZIP6*, codant pour une protéine de la famille des transporteurs régulés par le zinc et le fer.

Noccaea caerulescens et *A. thaliana* possèdent 88,5% d'identité dans les régions codantes et auraient divergé, il y a 20 millions d'années (Rigola *et al.*, 2006). Van de Mortel *et al.* (2006) a étudié la régulation des gènes par l'apport de Zn chez *N. caerulescens*. Elle a pu mettre en évidence 121 gènes qui étaient 5 fois plus régulés chez *Noccaea* que chez *Arabidopsis* et qui étaient différentiellement régulés selon la concentration en Zn. Parmi ces gènes, des gènes codant pour les transporteurs de métaux ZIP4 et IRT3 ainsi que 3 gènes codant des défensines sont fortement induits. Hammond *et al.* (2006) a comparé la régulation par le Zn des gènes de *N. caerulescens*, plante hyperaccumulatrice de Zn, et *N. arvensis*, son pendant non hyperaccumulateur, en hybridant leurs ADNc sur une puce à ADN Affymetrix d'*Arabidopsis*. De cette étude, il ressort que 5 000 gènes sont régulés dans les parties aériennes par le Zn chez *N. caerulescens* comparé à *N. arvensis*. Parmi ces gènes, on retrouve deux gènes codant pour des défensines, trois gènes codant pour des transporteurs de la famille des ZIP, ZIP6, ZIP7 et IRT3, et deux gènes codant pour des transporteurs de la famille des ATPases de type P_{1B}, HMA3 et HMA4.

Cette technique va être appliquée à *H. incana* et devrait permettre de mettre en évidence des gènes impliqués dans la tolérance au Pb. Une étude précédente a montré qu'*H. incana* et *A. thaliana* ont 89% d'identité au niveau des régions codantes et 85% au niveau des séquences de l'espaceur intergénique transcrit (ITS ; Chapitre 3, Auguy *et al.*, soumis). De plus, la comparaison entre le transcriptome d'*H. incana*, plante tolérante au Pb, et *A. thaliana*, plante sensible au Pb, devrait permettre de mettre en évidence les gènes spécifiquement exprimés ou sur-régulés chez *H. incana* lors d'une exposition au Pb.

2) Résultats

2-1) Choix de la concentration en Pb, du temps d'application et caractérisation physiologique du matériel végétal

Pour *H. incana*, la concentration en Pb qui permet d'avoir des plantes avec une bonne croissance et sans nécrose visible, et d'obtenir une réponse moléculaire est 100 μ M de Pb(NO₃)₂ en culture hydroponique (Chapitre 3, Auguy *et al.*, soumis).

Concernant *A. thaliana*, des tests de viabilité en fonction de la concentration en Pb ont été menés (fig. 20). Des graines d'*A. thaliana* ont été mises à germer sur un milieu nutritif gélosé contenant des concentrations croissantes en Pb(NO₃)₂ (0, 40, 60, 80 et 100 μ M). Une mesure de la longueur de la racine primaire de ces plantules a été réalisée (fig. 21).

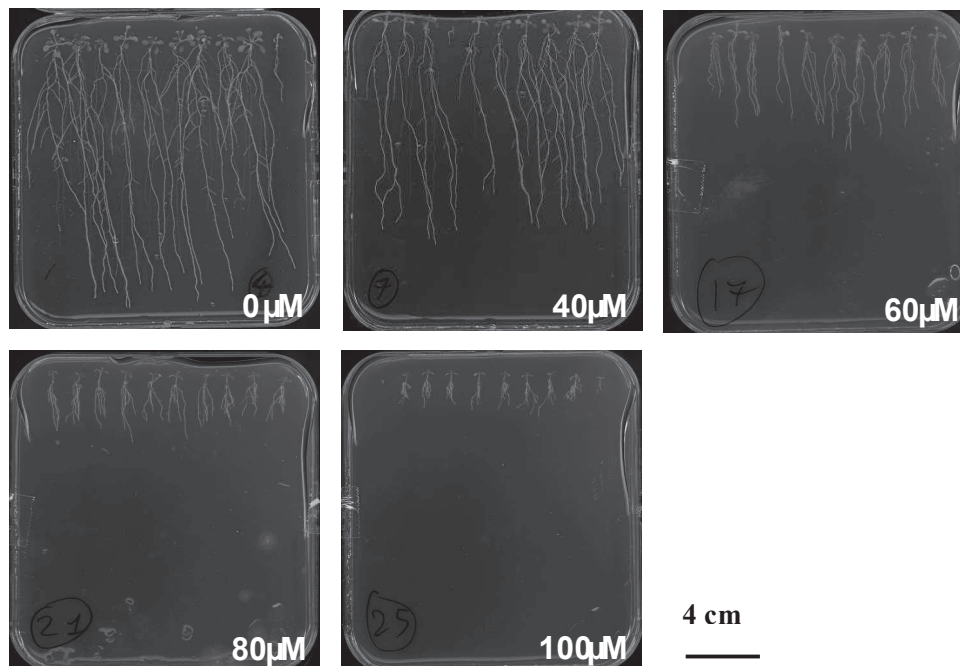


Figure 20 : Plantules d'*A. thaliana* cultivées pendant 13 jours en milieu gélosé contenant des concentrations croissantes en $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$: 0, 40, 60, 80 et 100 μM . Ces boîtes sont représentatives de 4 répétions.

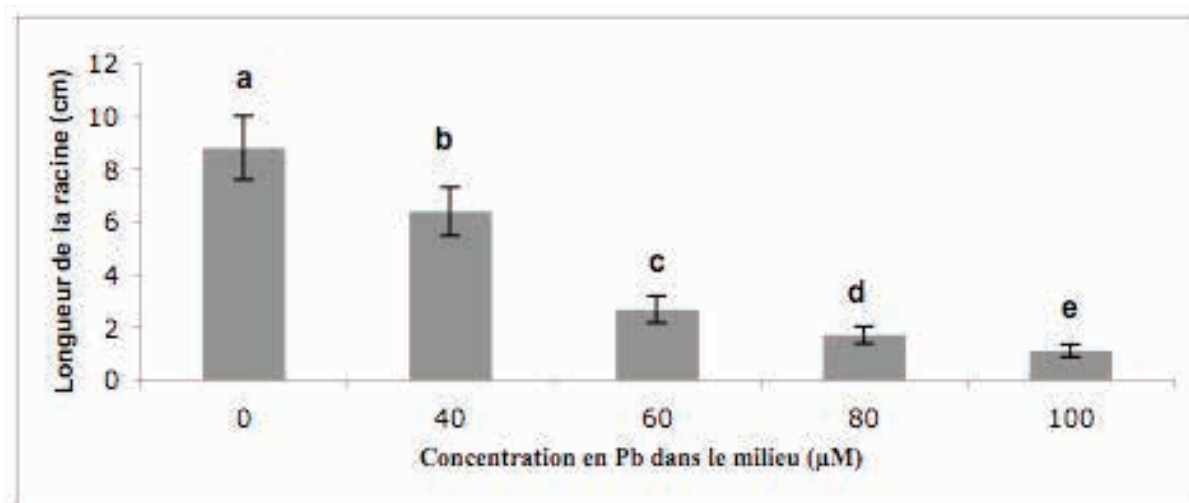


Figure 21 : Longueur de la racine primaire (en cm) de plantules d'*A. thaliana* cultivées pendant 13 jours en milieu gélosé en fonction de la concentration en $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ dans le milieu de culture. Les valeurs représentent des moyennes effectuées sur 40 individus \pm ET. Les échantillons, qui présentent des lettres différentes, sont significativement différents ($p < 0,05$).

Cette expérimentation montre qu'il y a une diminution de 30 % de la longueur de la racine primaire par rapport au contrôle sans Pb lorsque la concentration en $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ est de 40 μM dans le milieu de culture et qu'elle est de 60 % lorsque la concentration en $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ est de 60 μM pour atteindre 90 % pour la concentration à 100 μM . Au vue de ces résultats, la concentration maximale à appliquer pour *A. thaliana* est de 40 μM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. Nous avons donc choisi de ne pas appliquer la même concentration pour *H. incana*, plante tolérante au Pb, que pour *A. thaliana*, plante sensible au Pb.

La durée de traitement retenue est de 3 jours car, pendant cette période, une accumulation de Pb a été observée dans les racines d'*H. incana* mais surtout dans les parties aériennes. De plus, ce traitement provoque une réponse moléculaire (Chapitre 3, Auguy *et al.*, soumis), sans que les plantes ne semblent affectées par ce traitement. Ce même temps de traitement sera également appliqué à *A. thaliana*.

Les racines et les parties aériennes de 8 à 9 plantules âgées de 4 semaines, traitées pendant trois jours par 40 ou 100 μM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ pour *A. thaliana* et *H. incana* respectivement et en condition contrôle (sans Pb), ont été prélevées (fig. 22 et 23). Pour chaque espèce, *H. incana* et *A. thaliana*, trois répétitions biologiques ont été réalisées.



Figure 22 : Plantules d' *H. incana*, âgées de 4 semaines, après 3 jours de culture en milieu BD avec 100 μM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ à gauche (+ Pb) ou sans $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ à droite (- Pb).



Figure 23 : Plantules d'*A. thaliana* (Col-0), âgées de 4 semaines, après 3 jours de culture en milieu BD avec 40 μM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ à gauche (+ Pb) ou sans $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ à droite (- Pb).

La concentration en Pb a été mesurée, par ICP-AES, dans les parties aériennes et les racines des plantules d'*H. incana* et d'*A. thaliana*, traitées pendant 3 jours avec du Pb (tab. 4). Les dosages montrent des teneurs élevées en Pb dans les racines d'*H. incana* (66 mg de Pb/g de MS) et d'*A. thaliana* (83 mg de Pb/g de MS). Pour ces deux espèces, la teneur en Pb est beaucoup plus élevée au niveau des racines que des parties aériennes. Toutefois, la concentration en Pb est beaucoup plus élevée dans les parties aériennes d'*H. incana* avec 0,346 mg/g de MS contre seulement 0,006 mg/g de MS pour *A. thaliana*.

Tableau 4 : Dosage du Pb dans les parties aériennes (PA) et les racines (RAC) d'*Hirschfeldia incana* et d'*Arabidopsis thaliana* après 3 jours de culture en hydroponie sur un milieu contenant respectivement 100 et 40 μM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. Les valeurs représentent la moyenne \pm l'écart type de 3 répétitions réalisées sur 5 à 7 plantes.

	<i>H.incana</i>		<i>A. thaliana</i>	
	PA	RAC	PA	RAC
Pb (mg/g MS)	0,346 \pm 0,034	65,45 \pm 6,19	0,006 \pm 0,005	82,9 \pm 38,6

2-2) Analyse transcriptomique

2-2-1) Résultats globaux

La qualité des ARN a été vérifiée en utilisant un bioanalyseur (Agilent). Pour chaque échantillon, l'intégrité de l'ARN a été mesurée, elle est représentée par une valeur de RIN (RNA integrity number) qui est compris entre 0 et 10. Plus le RIN est proche de 0 et plus les ARN sont dégradés. De même, plus il est proche de 10 et plus les ARN sont de bonne qualité. En règle générale, un ARN qui a un RIN inférieur ou égal à 5 ne sera pas utilisé pour être

hybridé sur une puce à ADN. Les 24 échantillons d'ARN d'*H. incana* et d'*A. thaliana* montrent un RIN supérieur à 7. Ils sont de qualité suffisante pour être utilisés.

Pour chaque espèce, *H. incana*, l'espèce tolérante au Pb, et *A. thaliana*, l'espèce sensible, la comparaison du niveau d'expression des gènes, entre plantes traitées au Pb (+Pb) et plantes non traitées (-Pb), a été réalisée sur les parties aériennes et sur les racines.

Après normalisation et filtration des données d'expression, le nombre total de sondes retenues, après hybridation des ARN d'*H. incana* sur la puce Arabidopsis, est de 10 446 pour les parties aériennes, soit 24% du total des sondes et de 11 842 pour les racines, soit 27% du total des sondes. De même, pour *A. thaliana*, le nombre total de sondes retenues, après normalisation et filtration, est de 29 364, soit 67% du total des sondes pour les parties aériennes et de 32 589 pour les racines, soit 74% du total des sondes.

L'application du test de Student sur les données d'expression, entre les plantes traitées et non –traitées par le Pb, avec une probabilité de 0,05, permet de réduire fortement le nombre de sondes. Il ne reste plus que 724 et 1 571 sondes présentant une différence d'expression significative pour respectivement les parties aériennes et les racines d'*H. incana*. De même, pour *A. thaliana*, il ne reste que 5 475 et 18 254 sondes pour respectivement les parties aériennes et les racines.

L'étape suivante a consisté à éliminer la redondance dans les sondes. La puce 44K d'*A. thaliana* d'Agilent comporte 43 803 sondes qui couvrent l'ensemble du transcriptome d'Arabidopsis (27 235 ADNc). Ainsi, dans cette puce, certains ADNc peuvent être représentés sur la puce par deux ou trois sondes. Pour chaque ADNc auquel correspond plusieurs sondes, si le ratio (fold change, FC) entre les intensités normalisées +Pb et -Pb varie dans le même sens, c'est la sonde dont le signal est le plus élevé qui est conservé. Si le FC ne varie pas dans le même sens, les sondes sont éliminées. Pour *H. incana*, après élimination de la redondance, il y a 672 et 1 450 sondes pour les parties aériennes et les racines respectivement correspondant à un seul gène. Pour *A. thaliana*, il reste 4 617 et 13 821 sondes pour les parties aériennes et les racines respectivement.

Ensuite, classiquement dans le cadre d'une étude transcriptomique, ne sont conservées pour l'analyse que les sondes dont le FC est supérieur à 2,0 ou inférieur à 0,5. Pour *H. incana*, cela représente 385 et 754 gènes pour les parties aériennes et les racines respectivement et, pour *A. thaliana*, 87 et 4 330 gènes pour les parties aériennes et les racines respectivement. Le nombre de gènes régulés au niveau des parties aériennes d'*A. thaliana* est très faible, moins de 2% des gènes, alors qu'il est de 31% au niveau des racines.

Pour *H. incana*, au niveau des parties aériennes, la comparaison +Pb/-Pb révèle 220 gènes sur-réglés et 165 gènes sous-réglés. Au niveau des racines, 391 gènes sur-réglés et 363 gènes sous-réglés ont été identifiés chez les plantes traitées par le Pb par rapport aux plantes non-traitées.

Pour *A. thaliana*, au niveau des parties aériennes, la comparaison +Pb/-Pb révèle seulement 57 gènes sur-réglés et 30 gènes sous-réglés. Au niveau des racines, 2 155 gènes sur-exprimés et 2 175 gènes sous-réglés ont été identifiés chez les plantes traités par le Pb par rapport aux plantes non-traitées.

Pour les deux espèces, le nombre de gènes différentiellement réglés (sur- ou sous-) est plus important dans les racines que les parties aériennes. Cette différence est, sans doute, à mettre en relation avec des teneurs en Pb beaucoup plus importantes dans les racines que les parties aériennes (tab. 4). Elle est d'autant plus marquée pour *A. thaliana* que pour *H. incana* mais c'est bien en corrélation avec les différences de concentration en Pb trouvées pour les deux espèces (tab. 4).

2-2-2) Validation des puces

Afin de valider les données d'expression obtenues avec les puces à ADN, une quantification de l'expression génique a été réalisée par PCR quantitative (QPCR). Trente et un gènes présents sur la puce hétérologue *H. incana* (tab. 5) ainsi que six gènes présents sur la puce homologue *A. thaliana* (tab. 6) ont été sélectionnés. Les gènes ont été choisis dans les deux organes étudiés, parties aériennes et racines, dans les deux catégories sur- et sous-exprimés, et exprimés dans différentes voies (redox, transport, manipulation du métal).

Pour *H. incana*, l'expression des trente et un gènes testés varie dans le même sens (sur- ou sous- exprimée) que ce soit avec la puce à ADN ou avec la QPCR (tab. 5). Il existe, une bonne corrélation entre les résultats obtenus avec la puce et la QPCR (fig. 24). En effet, le coefficient de corrélation de la droite de régression est égal à 0,898 ce qui montre que l'expression des gènes mesurée avec la QPCR est proche de celle obtenue avec la puce à ADN. Les résultats obtenus par la QPCR pour trente et un gènes permettent de valider les résultats d'expression obtenus pour *H. incana* avec la puce à ADN hétérologue.

Tableau 5 : Comparaison des données d'expression de 31 gènes d'*H. incana* obtenues avec la puce Arabidopsis/*H.incana* et avec la QPCR. * : PA, parties aériennes et R, racines.

AGI	Annotation GO	Organe*	FC puce	FC QPCR
AT1G06650	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homolog 3	R	4,81	2,24
AT1G15180	MATE efflux family protein	R	4,96	27,09
AT1G22990	Heavy metal associated isoprenylated plant protein 22	R	5,76	5,10
AT2G26020	Plant defensin 1.2b	R	39,04	287,12
AT2G28660	Chloroplast-targeted copper chaperone protein	R	6,16	11,65
AT3G12750	Zinc transporter 1 precursor	R	2,96	4,77
AT4G08570	Heavy-metal-associated domain-containing protein	R	13,92	15,76
AT4G13420	High affinity K ⁺ transporter 5	R	0,06	0,07
AT4G17030	Expansin-like B1	R	25,23	54,13
AT4G25100	Fe superoxide dismutase 1	R	3,25	5,34
AT4G35090	Catalase 2	R	0,25	0,35
AT5G01600	Ferretin 1	R	3,68	3,17
AT5G02380	Metallothionein 2B	R	2,15	2,25
AT5G06530	ATP-binding cassette G22	R	2,65	2,04
AT5G09930	ATP-binding cassette F2	R	2,95	7,71
AT5G11930	Glutaredoxin-C10	R	3,64	3,77
AT5G13580	ATP-binding cassette G6	R	4,18	1,97
AT5G15410	Cyclic nucleotide gated channel 2	R	2,27	1,47
AT5G38960	Putative germin-like protein subfamily 1 member 12	R	0,02	0,01
AT1G74670	Gibberellin-regulated protein 6	PA	0,14	0,13
AT1G77510	Protein disulfide isomerase-like 1-2	PA	3,49	8,46
AT2G36380	ATP-binding cassette G34	PA	2,03	4,34
AT2G45180	Lipid transfer protein (LTP) family	PA	0,15	0,24
AT3G09390	Metallothionein 2A	PA	4,58	8,28
AT3G50560	Rossmann-fold NAD(P)-binding domain-containing protein	PA	0,13	0,25
AT3G59140	ATP-binding cassette C10	PA	2,10	1,52
AT4G11600	Glutathione peroxidase 6	PA	2,12	4,14
AT4G33020	Zinc transporter 9	PA	5,86	4,00
AT5G01600	Ferretin 1	PA	2,51	5,11
AT5G09930	ATP-binding cassette F2	PA	4,69	9,29
AT5G18600	Monothiol glutaredoxin-S2	PA	0,16	0,43
AT5G45690	Unknown protein	PA	25,84	47,39
AT5G59330	Lipid binding protein	PA	66,37	87,19

Tableau 6 : Comparaison des données d'expression de 7 gènes d'*A. thaliana* obtenues avec la puce Arabidopsis/*A. thaliana* et avec la QPCR. * : PA, parties aériennes et R, racines.

AGI	Annotation GO	Organe*	FC puce	FC QPCR
AT2G28660	Chloroplast-targeted copper chaperone protein	R	1,75	2,81
AT3G12750	Zinc transporter 1 precursor	R	6,37	17,09
AT4G35090	Catalase 2	R	0,50	0,95
AT5G01600	Ferretin 1	R	1,93	4,25
AT5G02380	Metallothionein 2B	R	2,81	5,01
AT3G09390	Metallothionein 2A	PA	1,86	1,20
AT5G01600	Ferretin 1	PA	1,18	1,07

Concernant *A. thaliana* (tab. 6), les résultats trouvés par QPCR valident également, ceux obtenus par la puce. Ainsi, on peut remarquer que, comme pour *H. incana*, l'expression des six gènes testés varie dans le même sens que ce soit avec la puce à ADN ou avec la QPCR (tab. 6). Ces résultats permettent de valider les résultats d'expression obtenus pour *A. thaliana* avec la puce à ADN.

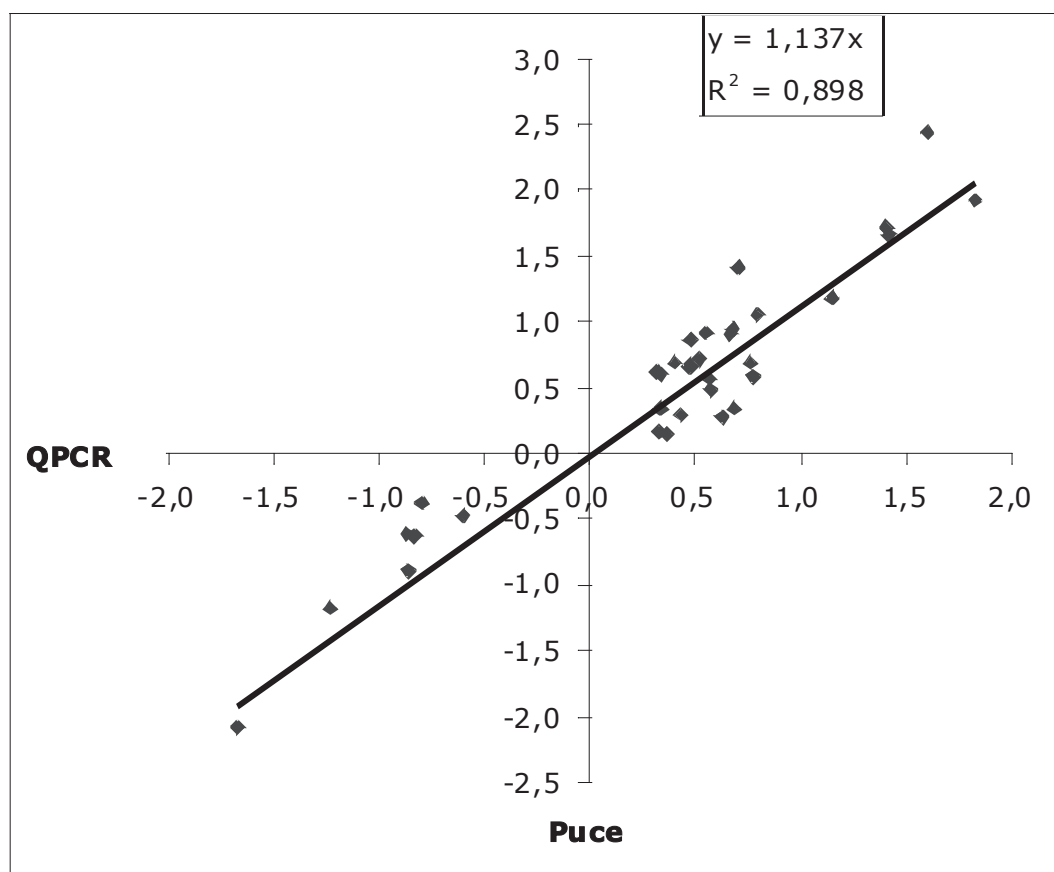


Figure 24 : Validation des données d'expression obtenues à partir de la puce hétérologue Arabidopsis/*Hirschfeldia incana*. Graphique représentant la corrélation entre les résultats d'expression de 31 gènes d'*H. incana* obtenus pour la puce Arabidopsis/*H. incana*. (Log10 en ordonnée) et en QPCR (Log10 en abscisse). La valeur des coordonnées est donnée dans le tableau 5.

2-2-3) Comparaison intraspécifique

Pour chaque espèce, une comparaison a été réalisée entre les gènes exprimés au niveau des parties aériennes et ceux exprimés au niveau des racines. Cette comparaison a été réalisée pour les gènes sur-exprimés (fig. 25A) et les gènes sous-exprimés (fig. 25B). Ces comparaisons sont illustrées à l'aide des diagrammes de Venn (logiciel Venny ; Oliveros, 2007).

Pour *H. incana*, parmi les 546 gènes sur-régulés, 65 d'entre eux le sont aussi bien au niveau des parties aériennes que des racines (fig. 25A). Cette valeur représente 30% des gènes sur-régulés au niveau des parties aériennes et 17% au niveau des racines (fig. 25A). De même, parmi les 505 gènes sous-régulés, 23 sont communs aux parties aériennes et aux racines ce qui représente 14% des gènes sous-régulés au niveau des parties aériennes et seulement 6% au niveau des racines (fig. 25B).

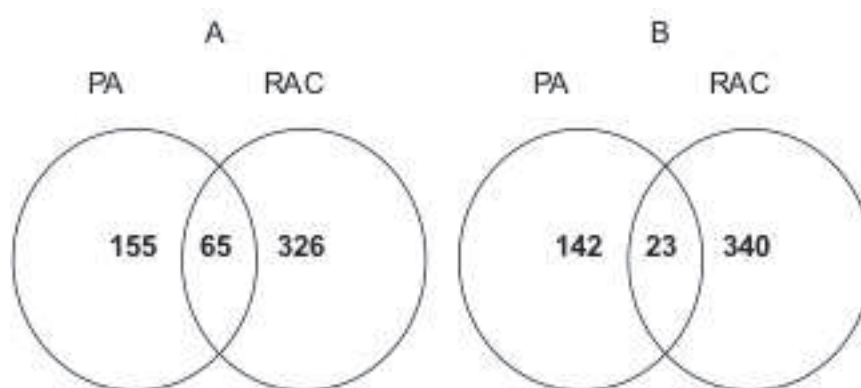


Figure 25 : Nombre de gènes d'*H. incana* dont l'expression est significativement régulée par le Pb dans les parties aériennes (PA) et les racines (RAC). Nombre de gènes sur-régulés (A) et sous-régulés (B).

Pour *A. thaliana*, parmi les 2 184 gènes sur-régulés, 28 d'entre eux le sont aussi bien au niveau des parties aériennes que des racines (fig. 26A). Cette valeur représente 49% des gènes sur-régulés au niveau des parties aériennes et seulement 1,3 % au niveau des racines (fig. 7A). De même, parmi les 2 189 gènes sous-régulés, 16 sont communs aux parties aériennes et aux racines, ce qui représente 53% des gènes sous-régulés au niveau des parties aériennes et seulement 0,7% au niveau des racines (fig. 26B).

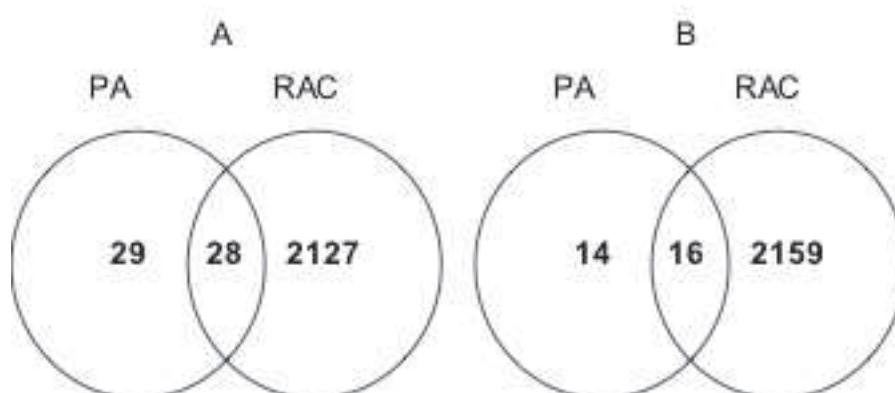


Figure 26: Nombre de gènes d'*A. thaliana* dont l'expression est significativement régulée par le Pb dans les parties aériennes (PA) et les racines (RAC). Nombre de gènes sur-régulés (A) et sous-régulés (B).

2-2-4) Comparaison interspécifique

L'objectif est de comparer le niveau de régulation des gènes suite à un traitement au Pb entre l'espèce tolérante au Pb, *H. incana*, et l'espèce sensible, *A. thaliana*. Cette comparaison va permettre de mettre en évidence les gènes régulés au niveau d'*H. incana*, mais qui ne le seraient pas au niveau d'*A. thaliana*. On peut émettre l'hypothèse que ces gènes, spécifiquement régulés chez *H. incana*, pourraient être impliqués dans la tolérance au Pb. Cette comparaison a été réalisée par organe (parties aériennes et racines) à l'aide de diagrammes de Venn.

Parmi les 467 gènes différentiellement régulés au niveau des parties aériennes, seuls 5 gènes sont communs aux 2 espèces (fig. 27A). Parmi ces 5 gènes communs, un seul est sous-exprimé pour les deux espèces, il code pour une protéine de liaison à l'ADN. Un de ces 5 gènes est sous-exprimé pour *H. incana* et sur-exprimé pour *A. thaliana*, il code pour un transporteur de sucre. Et enfin, trois gènes sont sur-exprimés pour les deux espèces et codent pour une protéine associée à la dormance et à l'auxine, une protéine de liaison à l'ARN (ML2) et une protéine de fonction inconnue.

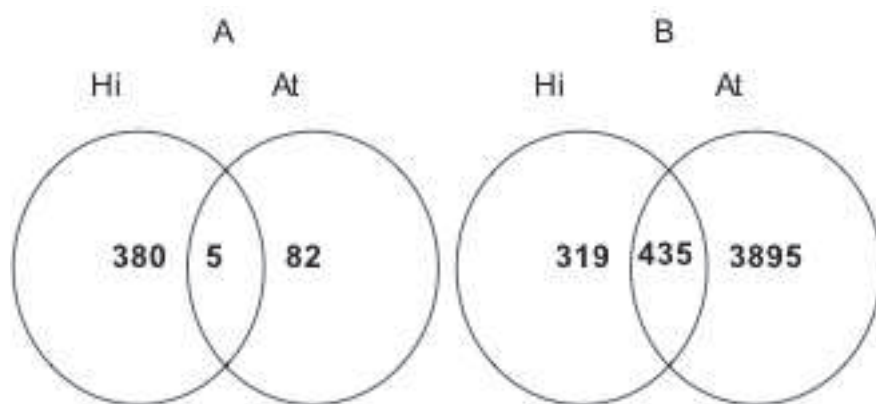


Figure 27: Nombre de gènes d'*H. incana* (Hi) et d'*A. thaliana* (At) dont l'expression est significativement régulée ($FC > 2$ ou $< 0,5$) au niveau des parties aériennes (A) et des racines (B).

Parmi les 380 gènes spécifiquement régulés au niveau des parties aériennes d'*H. incana*, 217 gènes sont induits. Parmi ces gènes, on retrouve de façon non exhaustive, des gènes codant pour des transporteurs ABC (PDR6 et MRP14), un transporteur de la famille CNGC (CNGC1), deux métallothionéines (M2Ta et MT2b) et une ferritine (FER1). Au niveau des parties aériennes d'*H. incana*, 163 gènes sont sous-régulés. De même, parmi les 82

gènes spécifiquement exprimés au niveau des parties aériennes d'*A. thaliana*, 53 sont sur-régulés et 29 sont sous-régulés.

Parmi les 4649 gènes différentiellement régulés au niveau des racines, 435 gènes sont communs aux 2 espèces (fig. 27B). Parmi ces 435 gènes communs, 204 sont sur-régulés pour les deux espèces (en vert dans les tab. S3 et S7), 208 sont sous-régulés pour les deux espèces. Ensuite, 5 sont sur-régulés pour *H. incana* et sous-régulés pour *A. thaliana*, il s'agit des gènes codant pour une oxydoréductase, une ACC oxydase, une β galactosidase, une IAA carboxylméthyltransférase et une arabinogalactane. Et enfin, 18 gènes sont sous-régulés pour *H. incana* et sur-régulés pour *A. thaliana*.

Parmi les 319 gènes spécifiquement régulés au niveau des racines d'*H. incana*, 182 gènes sont sur-régulés et on retrouve, de façon non exhaustive, des gènes codant pour des défensines (PDF 1.3 et PDF 1.2B), des transporteurs de type MATE et de type ZIP et une ferritine (FER1). 137 gènes sont sous-régulés au niveau des racines d'*H. incana*. De même, parmi les 3 895 gènes spécifiquement exprimés au niveau des racines d'*A. thaliana*, 1 933 sont sur-régulés et 1 962 sont sous-régulés.

2-2-5) Classification des gènes sur- régulés par catégorie fonctionnelle

Dans le but d'identifier des classes de gènes particulièrement affectées par le traitement au Pb, nous avons regroupé, par catégorie fonctionnelle, les gènes sur-régulés en utilisant l'annotation « Gene Ontology » (GO) de TAIR (Berardini *et al.*, 2004). Cela représente respectivement 220 et 57 gènes pour les parties aériennes d'*H. incana* et d'*A. thaliana* et 391 et 2 155 gènes pour les racines d'*H. incana* et d'*A. thaliana* respectivement.

Les diagrammes concernant les parties aériennes d'*H. incana* (fig. 28A) et les racines d'*H. incana* (fig. 28C) et d'*A. thaliana* (fig. 28D) présentent une distribution des gènes, par catégorie fonctionnelle, assez similaire, à quelques % près.

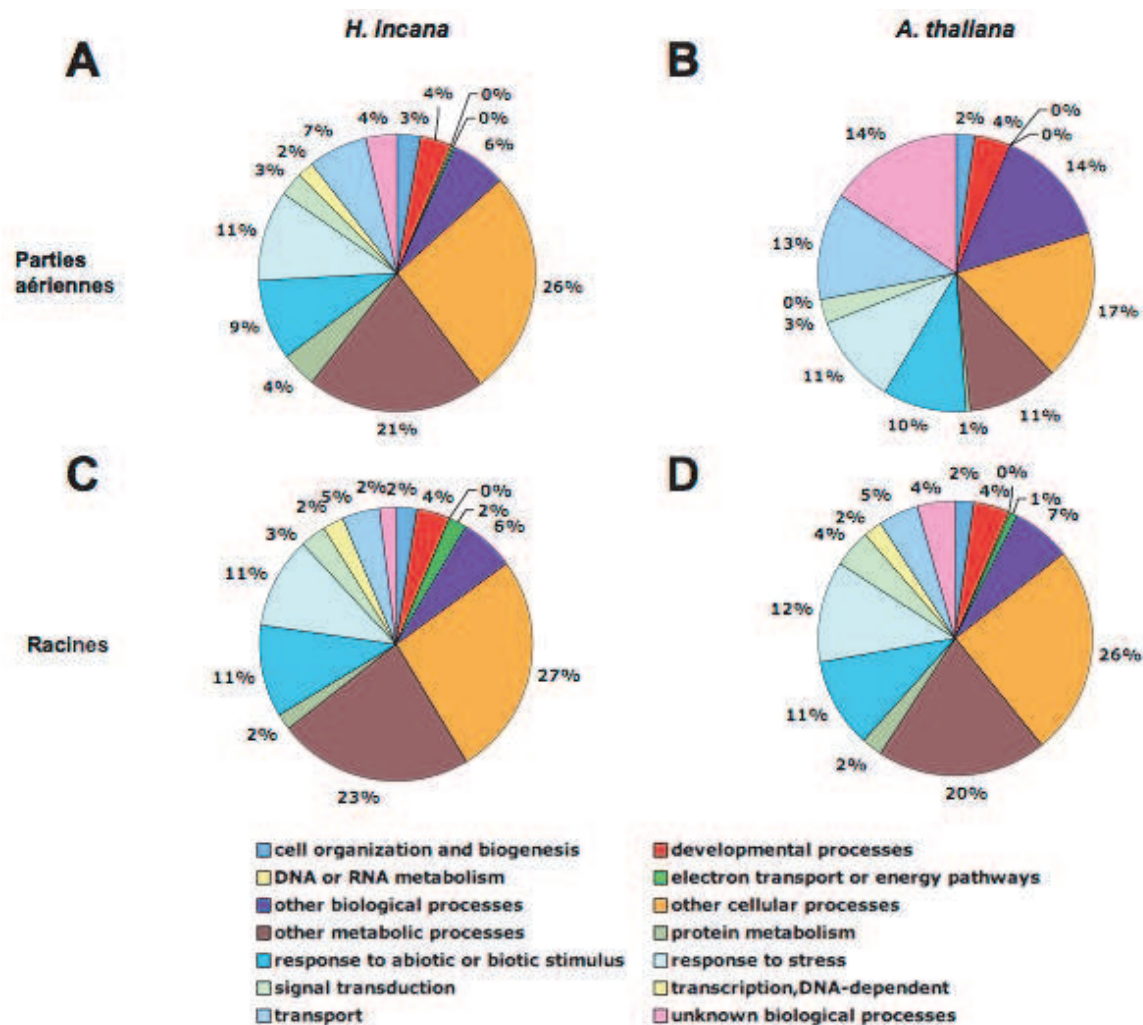


Figure 28 : Répartition par catégorie fonctionnelle, des gènes qui sont sur-régulés (FC puce >2,0), chez *H. incana* au niveau des parties aériennes (A) et des racines (C), et chez *A. thaliana*, au niveau des parties aériennes (B) et des racines (D). La classification des gènes a été réalisée en utilisant l'annotation « gene ontology (GO) de TAIR (Berardini *et al.*, 2004).

Les catégories les plus représentées sont celles qui concernent les processus cellulaires (26 à 27%) et métaboliques (20 à 23%), puis la réponse au stimulus biotique et abiotique (9 à 11%) et au stress (11 à 12%). Les gènes codant pour des protéines impliquées dans le transport représentent 5 à 7 % des gènes exprimés.

Par contre, la répartition des gènes pour les parties aériennes d'*A. thaliana* est différente des trois autres (fig. 28B). La part des gènes impliqués dans les processus cellulaire (17%) et métabolique (11%) est plus faible alors que la part des gènes impliqués dans le transport est plus importante, 13% contre 5 à 7%. De même, la part des gènes, dont la fonction est inconnue, est beaucoup plus importante avec 14% pour les parties aériennes d'*A. thaliana* contre 2 à 4% pour les 3 autres classifications (partie aériennes et racines d'*H. incana*, et racines d'*A. thaliana*). Il faut, toutefois, prendre ces résultats avec précaution car le nombre de gènes sur-exprimés au niveau des parties aériennes d'*A. thaliana* est faible avec seulement 57 gènes.

2-2-6) Choix des gènes candidats

Le nombre de gènes différentiellement exprimés reste encore très important (tab. S1 à S8). Afin de réduire ce nombre et de pouvoir accéder à une liste de gènes candidats, présents chez *H. incana* et susceptibles d'être impliqués dans la tolérance au Pb, nous avons appliqué de nouveaux filtres en nous appuyant sur les résultats obtenus avec *A. thaliana*. Les critères de sélection sont les suivants :

- Gènes d'*H. incana* dont l'expression est sur-réglée d'un FC supérieur à 2,0 par le traitement au Pb et spécifiques à *H. incana* par rapport à *A. thaliana*
- Gènes d'*H. incana* dont l'expression est sur-réglée par un FC supérieur à 2,0 par le traitement au Pb et dont l'expression est moins marquée chez *A. thaliana*, soit un ratio FC Hi/FC At supérieur à 2,0.

Parmi les gènes spécifiques d'*H. incana* et parmi ceux communs aux deux espèces, ce sont les gènes sur-réglés (FC>2 pour *H. incana*) qui semblent être les plus intéressants. En effet, pour que la plante puisse tolérer le Pb, les mécanismes adaptatifs, qui vont être mis en place, pourraient intervenir par une sur-expression de certains gènes particuliers tels que des gènes codant, par exemple, pour des transporteurs ou des chélateurs. Donc, le premier critère de tri a consisté à sélectionner les gènes d'*H. incana* qui sont spécifiquement sur-réglés au niveau des parties aériennes (217 gènes) et des racines (182 gènes).

L'étape suivante a consisté à utiliser la comparaison avec *A. thaliana*, la plante sensible au Pb, pour ne sélectionner parmi les gènes communs aux deux espèces que ceux qui sont plus sur-exprimés par le traitement au Pb chez *H. incana* que chez *A. thaliana*. Parmi les 5 gènes communs aux deux espèces au niveau des parties aériennes (fig. 27A), il n'existe qu'un seul gène dont le rapport entre le FC *H. incana* et le FC *A. thaliana* est supérieur à 2,0, il s'agit d'un gène (At2g33830) qui code pour une protéine associée à la dormance et à l'auxine (tab. 7). Parmi les 435 gènes communs aux deux espèces, au niveau des racines (fig. 27B), 20 gènes ont un rapport entre le FC *H. incana* et le FC *A. thaliana* est supérieur à 2,0 (tab. 8). Parmi eux, se trouvent un gène (At4g08570) codant pour un transporteur de métaux lourds et un gène (At5g66400) codant pour une protéine chaperonne (RAB18).

Au final, ce double crible a permis d'identifier, chez *H. incana*, une liste de gènes susceptibles d'être impliqués dans la tolérance au Pb et dont le nombre s'élève, à ce stade, à 218 gènes au niveau des parties aériennes (tab. 7) et à 202 gènes au niveau des racines (tab. 8).

Tableau 7 : Liste des gènes candidats, chez *H. incana*, au niveau des parties aériennes. spé : gènes spécifiques, up/up : gènes communs aux 2 espèces et sur-régulés chez *H. incana* et *A. thaliana*.

AGI	FC	Filtre	Description TAIR
AT5G59330	66,37	spé	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein
AT2G47770	27,00	spé	Encodes a membrane-bound protein designated AtTSPO
AT5G45690	25,84	spé	Protein of unknown function
AT3G08860	25,32	spé	alanine-glyoxylate aminotransferase, putative
AT3G03470	23,87	spé	CYP89A9; electron carrier/ heme binding / iron ion binding
AT4G30050	17,99	spé	unknown protein
AT4G33110	17,64	spé	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein
AT5G59310	17,31	spé	LTP4 (LIPID TRANSFER PROTEIN 4); lipid binding
AT5G10930	17,09	spé	CIPK5 (CBL-INTERACTING PROTEIN KINASE 5); ATP binding / kinase
AT4G17030	16,66	spé	ATEXLB1 (ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN-LIKE B1)
AT4G02280	16,27	spé	SUS3 (sucrose synthase 3); UDP-glycosyltransferase/ sucrose synthase
AT1G80130	16,26	spé	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein
AT5G15250	14,13	spé	FTSH6 (FTSH PROTEASE 6); ATP-dependent peptidase/ ATPase
AT4G33150	13,77	spé	lysine-ketoglutarate reductase
AT1G78780	12,01	spé	pathogenesis-related family protein
AT4G12580	11,22	spé	unknown protein
AT1G02470	11,12	spé	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein
AT2G02990	9,93	spé	RNS1 (RIBONUCLEASE 1); endoribonuclease/ ribonuclease
AT1G21000	9,47	spé	zinc-binding family protein
AT4G22870	9,13	spé	Sodium Bile acid symporter family; transporter activity
AT3G13672	8,65	spé	TRAF-like superfamily protein
AT5G25450	7,84	spé	ubiquinol-cytochrome C reductase complex 14 kDa protein, putative
AT4G12290	7,48	spé	amine oxidase/ copper ion binding
AT3G05400	7,31	spé	sugar transporter, putative
AT3G57520	7,10	spé	AtSIP2 (Arabidopsis thaliana seed imbibition 2)
AT3G03870	7,00	spé	unknown protein
AT1G54100	6,78	spé	ALDH7B4 (Aldehyde Dehydrogenase 7B4)
AT4G39210	6,70	spé	APL3; glucose-1-phosphate adenyltransferase
AT3G03170	6,63	spé	unknown protein
AT1G45249	6,58	spé	Abscisic acid responsive elements-binding factor 2 (ABF2)
AT2G33830	6,45	up/up	dormancy/auxin associated family protein
AT2G43590	6,13	spé	Chitinase family protein
AT1G64660	6,12	spé	ATMGL (ARABIDOPSIS THALIANA METHIONINE GAMMA-LYASE)

AT1G53580	6,06	spé	GLY3 (GLYOXALASE II 3); hydrolase/ hydroxyacylglutathione hydrolase
AT4G24960	5,99	spé	ATHVA22D; Homologous to a eukaryote specific ABA- and stress-inducible gene
AT1G17870	5,98	spé	EGY3 (Ethylene-dependent Gravitropism-deficient and Yellow-green-like 3)
AT1G72100	5,95	spé	late embryogenesis abundant domain-containing protein
AT1G09310	5,95	spé	unknown protein
AT4G33020	5,86	spé	ZIP9; cation transmembrane transporter/ metal ion transmembrane transporter
AT4G18830	5,84	spé	OFP5 (ARABIDOPSIS THALIANA OVATE FAMILY PROTEIN 5)
AT1G24030	5,82	spé	protein kinase family protein
AT3G57680	5,81	spé	peptidase S41 family protein
AT3G32980	5,62	spé	Peroxidase superfamily protein
AT5G23750	5,55	spé	remorin family protein
AT3G17110	5,53	spé	pseudogene, glycine-rich protein
AT2G29160	5,52	spé	similar to tropinone reductase I
AT4G37010	5,42	spé	caltractin, putative / centrin, putative
AT5G14450	5,36	spé	GDSL-motif lipase/hydrolase family protein
AT4G11650	5,22	spé	ATOSM34 (osmotin 34)
AT4G08770	5,04	spé	Peroxidase superfamily protein
AT1G58180	4,96	spé	beta carbonic anhydrase 6 (BCA6)
AT4G28530	4,95	spé	anac074 (Arabidopsis NAC domain containing protein 74)
AT3G51000	4,94	spé	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
AT3G23790	4,90	spé	acyl activating enzyme 16 (AAE16)
AT3G49570	4,87	spé	LSU3 (RESPONSE TO LOW SULFUR 3)
AT2G31110	4,79	spé	Encodes a member of the TBL (TRICHOME BIREFRINGENCE-LIKE) gene family
AT3G61450	4,75	spé	SYP73 (SYNTAXIN OF PLANTS 73); protein transporter
AT4G01610	4,75	spé	Cysteine proteinases superfamily protein
AT4G02360	4,72	spé	unknown protein
AT5G09930	4,69	spé	ATGCN2; transporter
AT3G09390	4,58	spé	MT2a (METALLOTHIONEIN 2a); copper ion binding
AT1G72660	4,51	spé	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein
AT5G47720	4,42	spé	acetyl-CoA C-acyltransferase, putative / 3-ketoacyl-CoA thiolase, putative
AT3G20250	4,35	spé	APUM5 (Arabidopsis Pumilio 5); RNA binding / binding
AT1G56300	4,31	spé	Chaperone DnaJ-domain superfamily protein
AT2G46680	4,31	spé	ATHB-7 (ARABIDOPSIS THALIANA HOMEODOMAIN 7); transcription activator
AT4G08870	4,30	spé	arginase, putative
AT5G63070	4,27	spé	40S ribosomal protein S15, putative
AT5G54080	4,27	spé	HGO (HOMOGENITISATE 1,2-DIOXYGENASE); homogentisate 1,2-dioxygenase
AT1G19650	4,23	spé	SEC14 cytosolic factor, putative / phosphoglyceride transfer protein, putative
AT1G51140	4,20	spé	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein
AT4G31330	4,20	spé	unknown protein
AT5G54840	4,18	spé	SGP1; GTP binding
AT2G23000	4,18	spé	scpl10 (serine carboxypeptidase-like 10); serine-type carboxypeptidase
AT3G15534	4,17	spé	unknown protein
AT3G57540	4,11	spé	remorin family protein
AT1G59860	4,11	spé	17,6 kDa class I heat shock protein (HSP17,6A-CI)
AT4G29820	4,10	spé	Encodes a homolog of the protein CFI-25, a polyadenylation factor subunit
AT3G29575	4,07	spé	AFP3 (ABI FIVE BINDING PROTEIN 3)
AT1G72770	4,05	spé	HAB1 (HOMOLOGY TO ABI1); catalytic/ protein serine/threonine phosphatase
AT2G47890	4,05	spé	zinc finger (B-box type) family protein
AT5G63800	4,03	spé	MUM2 (MUCILAGE-MODIFIED 2); beta-galactosidase
AT1G62290	4,00	spé	Saposin-like aspartyl protease family protein
AT3G12220	3,97	spé	scpl16 (serine carboxypeptidase-like 16); serine-type carboxypeptidase
AT4G32940	3,87	spé	GAMMA-VPE (GAMMA VACUOLAR PROCESSING ENZYME)
AT3G52060	3,85	spé	Core-2/I-branching beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase family protein
AT2G37678	3,82	spé	FHY1 (FAR-RED ELONGATED HYPOCOTYL 1); transcription regulator
AT5G57050	3,82	spé	ABI2 (ABA INSENSITIVE 2); protein serine/threonine phosphatase
AT3G17810	3,77	spé	Encodes a protein predicted to have dihydropyrimidine dehydrogenase activity
AT5G42800	3,72	spé	DFR (DIHYDROFLAVONOL 4-REDUCTASE); dihydrokaempferol 4-reductase
AT4G26080	3,68	spé	ABI1 (ABA INSENSITIVE 1); calcium ion binding / protein serine
AT3G20820	3,67	spé	Leucine-rich repeat (LRR) family protein
AT4G15960	3,67	spé	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
AT1G80920	3,67	spé	J8; heat shock protein binding / unfolded protein binding
AT1G13990	3,62	spé	unknown protein
AT4G22840	3,54	spé	bile acid:sodium symporter family protein
AT4G21580	3,53	spé	oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family protein
AT1G77510	3,49	spé	ATPDIL1-2 (PDI-LIKE 1-2); protein disulfide isomerase
AT2G33150	3,47	spé	PKT3 (PEROXISOMAL 3-KETOACYL-COA THIOLASE 3)
AT5G07920	3,46	spé	DGK1 (DIACYLGLYCEROL KINASE1); calcium ion binding
AT4G19760	3,46	spé	Glycosyl hydrolase family protein with chitinase insertion domain
AT1G28130	3,43	spé	GH3,17; indole-3-acetic acid amido synthetase
AT5G66650	3,38	spé	unknown protein
AT5G12200	3,30	spé	dihydropyrimidinase / DHPase / dihydropyrimidine amidohydrolase

AT4G31310	3,28	spé	avirulence-responsive protein-related
AT5G47830	3,28	spé	unknown protein
AT3G11150	3,26	spé	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
AT1G78860	3,22	spé	curculin-like (mannose-binding) lectin family protein
AT2G38540	3,21	spé	Non-specific lipid transfer protein
AT3G22200	3,21	spé	Pollen-pistil incompatibility 2 (POP2); 4-aminobutyrate transaminase
AT5G13580	3,21	spé	ABC-2 type transporter family protein
AT5G16340	3,19	spé	AMP-binding protein, putative
AT4G03320	3,18	spé	ZIP9 putative
AT2G30070	3,14	spé	ATKT1 (POTASSIUM TRANSPORTER 1)
AT1G23040	2,97	spé	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein
AT5G08380	2,96	spé	AGAL1 (ALPHA-GALACTOSIDASE 1); catalytic
AT1G08920	2,96	spé	ESL1, a transporter for monosaccharides; sugar transporter, putative
AT5G19590	2,94	spé	unknown protein
AT3G11410	2,93	spé	PP2CA (ARABIDOPSIS THALIANA PROTEIN PHOSPHATASE 2CA); protein binding
AT1G01240	2,91	spé	unknown protein
AT5G17220	2,90	spé	ATGSTF12 (ARABIDOPSIS THALIANA GLUTATHIONE S-TRANSFERASE PHI 12)
AT2G26230	2,90	spé	uricase / urate oxidase / nodulin 35, putative
AT1G02305	2,89	spé	cathepsin B-like cysteine protease, putative
AT1G75540	2,88	spé	STH2 (SALT TOLERANCE HOMOLOG2); transcription factor/ zinc ion binding
AT1G33030	2,87	spé	O-methyltransferase family 2 protein
AT1G74320	2,85	spé	choline kinase, putative
AT2G44130	2,85	spé	Galactose oxidase/kelch repeat superfamily protein
AT4G35300	2,85	spé	tonoplast monosaccharide transporter2 (TMT2)
AT1G01650	2,84	spé	SIGNAL PEPTIDE PEPTIDASE-LIKE 4 (SPPL4)
AT1G21920	2,84	spé	Histone H3 K4-specific methyltransferase SET7/9 family protein
AT2G43500	2,84	spé	RWP-RK domain-containing protein
AT5G43780	2,79	spé	APS4; sulfate adenylyltransferase (ATP)
AT4G30470	2,79	spé	cinnamoyl-CoA reductase-related
AT2G32150	2,76	spé	haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein
AT3G11900	2,73	spé	Aromatic and neutral transporter 1 (ANT1)
AT3G09950	2,72	spé	unknown protein
AT1G52565	2,68	spé	unknown protein
AT3G19990	2,66	spé	unknown protein
AT1G54040	2,65	spé	ESP (EPITHIOSPECIFIER PROTEIN); enzyme regulator
AT2G19310	2,65	spé	HSP20-like chaperones superfamily protein
AT4G21980	2,62	spé	APG8A (AUTOPHAGY 8A); APG8 activating enzyme
AT5G11610	2,59	spé	exostosin family protein
AT1G61800	2,59	spé	GPT2; antiporter/ glucose-6-phosphate transmembrane transporter
AT1G09500	2,58	spé	cinnamyl-alcohol dehydrogenase family / CAD family
AT2G33480	2,57	spé	ANAC041 (Arabidopsis NAC domain containing protein 41)
AT3G15990	2,57	spé	SULTR3;4 (SULFATE TRANSPORTER 3;4); sulfate transmembrane transporter
AT3G48530	2,56	spé	KING1 (SNF1-RELATED PROTEIN KINASE REGULATORY SUBUNIT GAMMA 1)
AT2G07640	2,56	spé	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
AT5G03520	2,56	spé	ATRA8C; GTP binding
AT1G13090	2,55	spé	CYP71B28; electron carrier/ heme binding / iron ion binding
AT1G72830	2,53	spé	NF-YA3 (NUCLEAR FACTOR Y, SUBUNIT A3); transcription factor
AT4G27020	2,53	spé	unknown protein
AT5G01600	2,51	spé	ATFER1; ferric iron binding
AT1G76520	2,51	spé	auxin efflux carrier family protein
AT2G39780	2,50	spé	RNS2 (RIBONUCLEASE 2); RNA binding / endoribonuclease/ ribonuclease T2
AT1G52080	2,49	spé	AR791; actin binding
AT1G63010	2,49	spé	SPX (SYG1/Pho81/XPR1) domain-containing protein
AT2G23790	2,49	spé	unknown protein
AT3G55030	2,48	spé	PGPS2 (phosphatidylglycerolphosphate synthase 2)
AT4G29190	2,44	spé	zinc finger (CCCH-type) family protein
AT4G16520	2,44	spé	ATG8F (autophagy 8f); microtubule binding
AT3G17000	2,43	spé	UBC32 (ubiquitin-conjugating enzyme 32); ubiquitin-protein ligase
AT2G37540	2,42	spé	short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein
AT5G02380	2,42	spé	MT2b (METALLOTHIONEIN 2b); copper ion binding
AT3G44540	2,41	spé	FAR4 (FATTY ACID REDUCTASE 4); binding / catalytic
AT3G28940	2,40	spé	AIG2-like (avirulence induced gene) family protein
AT3G50830	2,39	spé	COR413-PM2 (COLD-REGULATED 413-PLASMA MEMBRANE 2)
AT2G23030	2,38	spé	SNRK2,9 (SNF1-RELATED PROTEIN KINASE 2,9); ATP binding / kinase
AT5G57800	2,38	spé	CER3 (ECERIFERUM 3); binding / catalytic/ iron ion binding
AT1G19630	2,38	spé	CYP722A1; electron carrier/ heme binding / iron ion binding
AT1G53470	2,38	spé	MSL4 (MECHANOSENSITIVE CHANNEL OF SMALL CONDUCTANCE-LIKE 4)
AT5G58690	2,37	spé	phosphoinositide-specific phospholipase C family protein
AT5G23850	2,37	spé	unknown protein
AT2G45910	2,36	spé	U-box domain-containing protein kinase family protein
AT4G36400	2,34	spé	Encodes a (D)-2-hydroxyglutarate dehydrogenase

AT2G44100	2,32	spé	ATGDI1 (A, thaliana guanosine nucleotide diphosphate dissociation inhibitor 1)
AT5G62200	2,32	spé	Embryo-specific protein 3, (ATS3)
AT3G22600	2,31	spé	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein
AT3G20080	2,29	spé	CYP705A15; electron carrier/ heme binding / iron ion binding
AT1G28330	2,29	spé	dormancy-associated protein (DRM1)
AT5G16840	2,28	spé	BPA1 (BINDINGPARTNEROFACD11 1); nucleic acid binding
AT4G26580	2,27	spé	protein binding / zinc ion binding
AT4G39235	2,27	spé	unknown protein
AT1G73010	2,26	spé	phosphate starvation-induced gene 2 (PS2)
AT5G41340	2,26	spé	UBC4 (UBIQUITIN CONJUGATING ENZYME 4); ubiquitin-protein ligase
AT5G40382	2,25	spé	cytochrome-c oxidase
AT5G07440	2,24	spé	GDH2 (Glutamate dehydrogenase 2); ATP binding
AT2G46370	2,23	spé	JAR1 (JASMONATE RESISTANT 1); ATP binding / adenyltransferase/ catalytic
AT4G15610	2,21	spé	Uncharacterised protein family
AT4G34900	2,19	spé	XDH2 (XXANTHINE DEHYDROGENASE 2)
AT1G54130	2,19	spé	RSH3 (RELA/SPOT HOMOLOG 3); GTP diphosphokinase
AT1G13280	2,18	spé	AOC4 (ALLENE OXIDE CYCLASE 4); allene-oxide cyclase
AT1G71030	2,16	spé	MYBL2 (ARABIDOPSIS MYB-LIKE 2); DNA binding / transcription factor
AT4G20110	2,16	spé	VACUOLAR SORTING RECEPTOR 7 (VSR7)
AT3G18280	2,16	spé	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein
AT3G16640	2,14	spé	Encodes a protein homologous to translationally controlled tumor protein
AT1G17840	2,14	spé	WBC11 (WHITE-BROWN COMPLEX HOMOLOG PROTEIN 11)
AT4G11600	2,12	spé	ATGPX6 (GLUTATHIONE PEROXIDASE 6); glutathione peroxidase
AT3G58170	2,12	spé	BS14A (BET1P/SFT1P-LIKE PROTEIN 14A); SNAP receptor
AT5G03560	2,11	spé	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein; cation symporter
AT4G03030	2,10	spé	kelch repeat-containing F-box family protein
AT1G71950	2,10	spé	Proteinase inhibitor, propeptide
AT3G59140	2,10	spé	ATMRP14; ATPase, coupled to transmembrane movement of substances
AT3G21710	2,09	spé	unknown protein
AT2G02060	2,09	spé	Homeodomain-like superfamily protein
AT5G55970	2,07	spé	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
AT4G15210	2,07	spé	BAM5 (BETA-AMYLASE 5); beta-amylase
AT4G37180	2,07	spé	myb family transcription factor
AT1G74020	2,05	spé	SS2 (STRICTOSIDINE SYNTHASE 2); strictosidine synthase
AT5G25900	2,04	spé	GA3 (GA REQUIRING 3); ent-kaurene oxidase/ oxygen binding
AT4G24910	2,04	spé	unknown protein
AT1G10040	2,04	spé	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
AT2G36380	2,03	spé	PDR6; ATPase, coupled to transmembrane movement of substances
AT5G02880	2,03	spé	UPL4; ubiquitin-protein ligase
AT4G25570	2,03	spé	ACYB-2; carbon-monoxide oxygenase
AT3G61960	2,02	spé	protein kinase family protein
AT5G02020	2,02	spé	unknown protein
AT1G61050	2,02	spé	alpha 1,4-glycosyltransferase family protein

Tableau 8 : Liste des gènes candidats, chez *H. incana*, au niveau des racines. spé : gènes spécifiques, up/up : gènes communs aux 2 espèces, sur-régulés chez *H. incana* et *A. thaliana*, up/down : gènes communs aux 2 espèces, sur-régulés chez *H. incana* et sous-régulés chez *A. thaliana* .

AGI	FC	Filtre	Description TAIR
AT2G26010	50,67	spé	PDF1,3 (plant defensin 1,3)
AT2G26020	39,04	spé	PDF1,2b (plant defensin 1,2b)
AT4G17030	25,23	up/up	ATEXLB1 (ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN-LIKE B1)
AT3G02480	23,99	spé	ABA-responsive protein-related
AT3G09950	20,02	up/up	unknown protein
AT5G66400	19,42	up/up	RAB18 (RESPONSIVE TO ABA 18)
AT1G52400	18,05	up/up	BGLU18 (BETA GLUCOSIDASE 18); catalytic/ cation binding
AT2G14610	16,63	spé	PR1 (PATHOGENESIS-RELATED GENE 1)
AT5G07330	16,55	spé	unknown protein
AT4G12580	14,18	spé	unknown protein
AT4G08570	13,92	up/up	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein
AT5G10930	13,23	spé	CIPK5 (CBL-INTERACTING PROTEIN KINASE 5); ATP binding / kinase
AT3G21370	11,34	spé	beta glucosidase 19 (BGLU19)
AT4G20800	9,12	spé	FAD-binding domain-containing protein
AT4G25700	8,54	spé	BETA-OHASE 1 (BETA-HYDROXYLASE 1); carotene beta-ring hydroxylase
AT3G17110	8,11	spé	pseudogene, glycine-rich protein
AT5G54270	7,42	up/up	LHCB3 (LIGHT-HARVESTING CHLOROPHYLL B-BINDING PROTEIN 3); structural molecule
AT5G47560	7,21	spé	TDT (TONOPLAST DICARBOXYLATE TRANSPORTER); malate transmembrane transporter

AT1G29910	7,10	up/up	CAB3 (CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN 3); chlorophyll binding
AT1G29930	6,55	up/up	CAB1 (CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN 1); chlorophyll binding
AT1G32770	6,33	spé	ANAC012 (ARABIDOPSIS NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 12)
AT2G28660	6,16	spé	copper-binding family protein
AT3G03170	5,90	up/up	unknown protein
AT1G22990	5,76	spé	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein
AT2G24210	5,61	spé	TPS10 (terpene synthase 10); (E)-beta-ocimene synthase/ myrcene synthase
AT2G21970	5,54	spé	SEP2 (STRESS ENHANCED PROTEIN 2); chlorophyll binding
AT3G54890	5,51	spé	LHCA1; chlorophyll binding
AT4G33150	5,47	spé	lysine-ketoglutarate reductase
AT5G28450	5,44	spé	Chlorophyll A-B binding family protein
AT2G34430	5,22	up/up	LHB1B1; chlorophyll binding
AT1G45249	5,19	spé	Abscisic acid responsive elements-binding factor 2 (ABF2)
AT2G34420	5,14	up/up	LHB1B2; chlorophyll binding
AT3G47470	5,02	spé	LHCA4 (LIGHT-HARVESTING CHLOROPHYLL-PROTEIN COMPLEX I SUBUNIT A4)
AT1G15180	4,96	spé	MATE efflux family protein
AT1G53580	4,95	spé	GLY3 (GLYOXALASE II 3); hydrolase/ hydroxyacylglutathione hydrolase
AT1G06570	4,93	up/up	PDS1 (PHYTOENE DESATURATION 1); 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase
AT4G37970	4,84	spé	CAD6 (CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE 6); binding / catalytic/ oxidoreductase
AT1G06650	4,81	up/up	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, putative
AT4G19760	4,80	spé	Glycosyl hydrolase family protein with chitinase insertion domain
AT4G22530	4,38	up/up	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein
AT5G57050	4,38	spé	ABI2 (ABA INSENSITIVE 2); protein serine/threonine phosphatase
AT1G51400	4,38	spé	Photosystem II 5 kD protein
AT2G44130	4,27	spé	Galactose oxidase/kelch repeat superfamily protein
AT1G58270	4,23	spé	ZW9
AT2G30570	4,20	up/up	PSBW (PHOTOSYSTEM II REACTION CENTER W)
AT2G46770	4,19	spé	EMB2301 (EMBRYO DEFECTIVE 2301); transcription activator/ transcription factor
AT5G13580	4,18	spé	ABC-2 type transporter family protein
AT1G60420	4,00	spé	DC1 domain-containing protein
AT1G21680	3,96	spé	DPP6 N-terminal domain-like protein
AT4G26080	3,90	spé	ABI1 (ABA INSENSITIVE 1); calcium ion binding / protein serine
AT1G72770	3,89	spé	HAB1 (HOMOLOGY TO ABI1); catalytic/ protein serine/threonine phosphatase
AT1G31330	3,87	spé	PSAF (photosystem I subunit F)
AT3G13672	3,81	spé	TRAF-like superfamily protein
AT4G28370	3,80	spé	protein binding / zinc ion binding
AT5G16030	3,76	spé	unknown protein
AT5G01600	3,68	spé	ATFER1; ferric iron binding
AT1G08380	3,66	spé	PSAO (photosystem I subunit O)
AT5G65230	3,64	spé	AtMYB53 (myb domain protein 53); DNA binding / transcription factor
AT1G30380	3,61	spé	PSAK (photosystem I subunit K)
AT4G24910	3,59	spé	unknown protein
AT1G55670	3,57	spé	PSAG (PHOTOSYSTEM I SUBUNIT G)
AT2G43580	3,54	spé	Chitinase family protein
AT3G28520	3,45	spé	AAA-type ATPase family protein
AT4G38410	3,45	spé	Dehydrin family protein
AT3G11410	3,45	spé	PP2CA (ARABIDOPSIS THALIANA PROTEIN PHOSPHATASE 2CA); protein binding
AT1G17870	3,43	spé	EGY3 (Ethylene-dependent Gravitropism-deficient and Yellow-green-like 3)
AT4G25300	3,43	up/down	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein
AT2G31560	3,42	spé	unknown protein
AT1G60970	3,38	spé	clathrin adaptor complex small chain family protein
AT5G37478	3,36	spé	TPX2 (targeting protein for Xklp2) protein family
AT1G55910	3,33	spé	ZIP11 (ZINC TRANSPORTER 11 PRECURSOR); cation transmembrane transporter
AT1G09610	3,31	spé	unknown protein
AT1G51140	3,31	spé	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein
AT3G26150	3,24	spé	putative cytochrome P450
AT3G48770	3,24	spé	ATP binding / DNA binding
AT5G03990	3,16	spé	unknown protein
AT3G57950	3,15	spé	unknown protein
AT5G47720	3,14	spé	acetyl-CoA C-acyltransferase, putative / 3-ketoacyl-CoA thiolase, putative
AT1G62380	3,14	up/down	ACO2 (ACC OXIDASE 2); 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase
AT4G37360	3,13	spé	CYP81D2; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase
AT4G04880	3,12	spé	adenosine/AMP deaminase family protein
AT5G45110	3,12	spé	NPR3 (NPR1-LIKE PROTEIN 3); protein binding
AT5G66460	3,10	spé	(1-4)-beta-mannan endohydrolase, putative
AT3G26580	3,09	spé	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein
AT2G03590	3,09	spé	ATUPS1 (ARABIDOPSIS THALIANA UREIDE PERMEASE 1)
AT2G47890	3,08	spé	zinc finger (B-box type) family protein
AT1G63910	3,03	spé	AtMYB103 (myb domain protein 103); DNA binding / transcription activator
AT5G47810	3,03	spé	PFK2 (PHOSPHOFRUCTOKINASE 2); 6-phosphofructokinase
AT1G05010	3,00	spé	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase

AT1G75730	2,99	spé	unknown protein
AT5G09930	2,95	spé	ATGCN2; transporter
AT1G75170	2,95	spé	Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein
AT1G08290	2,94	spé	zinc finger (C2H2 type) protein (WIP3)
AT5G47640	2,93	spé	NF-YB2 (NUCLEAR FACTOR Y, SUBUNIT B2); transcription factor
AT1G78070	2,93	spé	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein
AT1G67300	2,91	spé	hexose transporter, putative
AT1G73830	2,86	spé	BR enhanced expression 3 (BEE3); DNA binding / transcription factor
AT5G56870	2,86	up/down	BGAL4 (beta-galactosidase 4); beta-galactosidase
AT5G17460	2,86	spé	unknown protein
AT3G05165	2,84	spé	sugar transporter, putative
AT3G61450	2,84	spé	SYP73 (SYNTAXIN OF PLANTS 73); protein transporter
AT4G30470	2,83	spé	cinnamoyl-CoA reductase-related
AT2G22150	2,82	spé	pseudogene, hypothetical protein
AT5G17450	2,76	spé	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein
AT5G58070	2,76	spé	TIL (TEMPERATURE-INDUCED LIPOCALIN); binding / transporter
AT1G34420	2,74	spé	leucine-rich repeat family protein / protein kinase family protein
AT4G30975	2,71	spé	Unknown protein
AT3G22600	2,71	spé	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein
AT4G21580	2,68	spé	oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family protein
AT5G45020	2,68	spé	Glutathione S-transferase family protein
AT4G13670	2,67	spé	PTAC5 (PLASTID TRANSCRIPTIONALLY ACTIVE5); heat shock protein binding
AT4G17250	2,66	spé	unknown protein
AT5G53370	2,63	spé	PMEPCR (PECTIN METHYLESTERASE PCR FRAGMENT F); pectinesterase
AT4G39700	2,62	spé	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein
AT4G34350	2,61	spé	4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate reductase
AT4G27435	2,60	spé	unknown protein
AT1G56220	2,59	spé	dormancy/auxin associated family protein
AT1G52230	2,57	spé	photosystem I subunit H2 (PSAH2)
AT3G21500	2,56	spé	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase
AT5G25890	2,55	spé	IAA28 (INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 28); transcription factor
AT2G29290	2,54	spé	tropinone reductase, putative / tropine dehydrogenase, putative
AT1G61600	2,54	spé	unknown protein
AT2G26070	2,53	spé	RTE1 (REVERSION-TO-ETHYLENE SENSITIVITY1)
AT2G35060	2,53	spé	KUP11; potassium ion transmembrane transporter
AT1G67710	2,52	spé	ARR11 (RESPONSE REGULATOR 11); transcription factor
AT3G59140	2,52	spé	ATMRP14; ATPase, coupled to transmembrane movement of substances
AT1G19650	2,50	spé	SEC14 cytosolic factor, putative / phosphoglyceride transfer protein, putative
AT3G22200	2,47	spé	Pollen-pistil incompatibility 2 (POP2); 4-aminobutyrate transaminase
AT2G47400	2,46	spé	CP12-1
AT5G53120	2,45	spé	SPDS3 (SPERMIDINE SYNTHASE 3); spermidine synthase/ spermine synthase
AT1G06680	2,45	spé	PSBP-1 (PHOTOSYSTEM II SUBUNIT P-1); poly(U) binding
AT1G55760	2,45	spé	BTB/POZ domain-containing protein
AT2G41130	2,44	spé	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein
AT3G10450	2,44	spé	SCPL7 (SERINE CARBOXYPEPTIDASE-LIKE 7); serine-type carboxypeptidase
AT1G07380	2,43	spé	ceramidase family protein
AT1G16720	2,43	spé	HCF173 (high chlorophyll fluorescence phenotype 173); binding
AT5G23760	2,43	spé	Copper transport protein family
AT5G17420	2,42	spé	IRX3 (IRREGULAR XYLEM 3); cellulose synthase
AT4G04630	2,42	spé	unknown protein
AT5G44720	2,40	spé	molybdenum cofactor sulfurase family protein
AT3G25890	2,39	spé	member of the ERF (ethylene response factor) subfamily B-6 of ERF
AT5G60360	2,39	spé	AALP (Arabidopsis aleurain-like protease); cysteine-type peptidase
AT4G26580	2,37	spé	protein binding / zinc ion binding
AT4G27830	2,35	spé	BGLU10 (BETA GLUCOSIDASE 10); catalytic/ cation binding
AT2G16895	2,35	spé	pseudogene
AT5G55250	2,35	up/down	IAMT1 (IAA CARBOXYLMETHYLTRANSFERASE 1)
AT2G36590	2,34	spé	ProT3 (PROLINE TRANSPORTER 3); L-proline transmembrane transporter
AT2G46590	2,34	spé	DAG2 (DOF AFFECTING GERMINATION 2); DNA binding / transcription factor
AT4G05320	2,32	spé	polyubiquitin 10
AT3G14230	2,32	spé	member of the ERF (ethylene response factor) subfamily B-2 of ERF
AT5G24105	2,31	up/down	AGP41 (ARABINOGLACTAN-PROTEIN 41)
AT1G64620	2,31	spé	Dof-type zinc finger domain-containing protein
AT4G37890	2,28	spé	EDA40 (embryo sac development arrest 40); protein binding
AT4G29820	2,28	spé	Encodes a homolog of the protein CFI-25, a polyadenylation factor subunit
AT5G15410	2,27	spé	DND1 (DEFENSE NO DEATH 1); calcium channel/ calmodulin binding
AT1G12780	2,26	spé	UGE1 (UDP-D-glucose/UDP-D-galactose 4-epimerase 1); UDP-glucose 4-epimerase
AT1G17230	2,26	spé	Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein
AT2G33310	2,26	spé	IAA13; transcription factor
AT4G35300	2,25	spé	tonoplast monosaccharide transporter2 (TMT2)
AT1G75030	2,25	spé	ATLP-3

AT5G23920	2,24	spé	unknown protein
AT1G71040	2,22	spé	LPR2 (Low Phosphate Root2); copper ion binding / oxidoreductase
AT4G11910	2,21	spé	unknown protein
AT3G03440	2,21	spé	armadillo/beta-catenin repeat family protein
AT2G47240	2,21	spé	long-chain-fatty-acid--CoA ligase family protein
AT1G10370	2,21	spé	ERD9 (EARLY-RESPONSIVE TO DEHYDRATION 9); glutathione transferase
AT3G59690	2,20	spé	IQD13 (IQ-domain 13); calmodulin binding
AT3G27400	2,20	spé	pectate lyase family protein
AT5G01670	2,19	spé	aldose reductase, putative
AT1G71695	2,17	spé	peroxidase 12 (PER12) (P12) (PRXR6)
AT5G46240	2,17	spé	KAT1 (POTASSIUM CHANNEL IN ARABIDOPSIS THALIANA 1); cyclic nucleotide binding
AT3G59050	2,16	spé	ATPAO3 (Polyamine oxidase 3)
AT5G55970	2,14	spé	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
AT5G18850	2,14	spé	unknown protein
AT1G13280	2,13	spé	AOC4 (ALLENE OXIDE CYCLASE 4); allene-oxide cyclase
AT1G23800	2,11	spé	ALDH2B7; 3-chloroallyl aldehyde dehydrogenase/ aldehyde dehydrogenase (NAD)
AT5G55420	2,11	spé	Encodes a Protease inhibitor/seed storage/LTP family protein [pseudogene]
AT1G09880	2,11	spé	Rhamnogalacturonate lyase family protein
AT5G66440	2,08	spé	unknown protein
AT4G23410	2,08	spé	TET5 (TETRASPANIN5)
AT5G59780	2,07	spé	MYB59 (MYB DOMAIN PROTEIN 59); DNA binding / transcription factor
AT4G05050	2,07	spé	UBQ11 (UBIQUITIN 11); protein binding
AT4G24140	2,07	spé	hydrolase, alpha/beta fold family protein
AT1G52570	2,06	spé	PLDALPHA2 (phospholipase d alpha 2); phospholipase D
AT5G57685	2,06	spé	AtGDU3 (Arabidopsis thaliana GLUTAMINE DUMPER 3)
AT1G06760	2,06	spé	histone H1, putative
AT1G08570	2,06	spé	ACHT4 (Atypical Cys His rich Thioredoxin 4)
AT1G03040	2,05	spé	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein
AT5G54980	2,05	spé	unknown protein
AT3G03980	2,04	spé	short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein
AT5G41040	2,04	spé	feruloyl-CoA transferase required for suberin synthesis
AT5G07440	2,04	spé	GDH2 (Glutamate dehydrogenase 2); ATP binding
AT2G37090	2,04	spé	IRX9 (Irregular Xylem 9); transferase, transferring glycosyl groups / xylosyltransferase
AT5G02790	2,03	spé	Glutathione transferase L3 (GSTL3)
AT2G43400	2,03	spé	electron-transfer flavoprotein:ubiquinone oxidoreductase (ETFQO); electron carrier
AT1G23740	2,03	spé	oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family protein
AT1G31800	2,02	spé	CYP97A3 (CYTOCHROME P450-TYPE MONOOXYGENASE 97A3)
AT4G09750	2,01	spé	short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein
AT4G01610	2,01	spé	Cysteine proteinases superfamily protein
AT2G33150	2,01	spé	PKT3 (PEROXISOMAL 3-KETOACYL-COA THIOLASE 3)
AT1G74520	2,01	spé	ATHVA22A
AT5G58490	2,00	spé	cinnamoyl-CoA reductase family

Afin de mieux caractériser ces gènes et d'affiner la sélection de gènes candidats, nous avons utilisé le logiciel MapMan (Thimm *et al.*, 2004), outil développé pour la plante modèle *Arabidopsis*. Ce logiciel permet de visualiser, par catégorie fonctionnelle, le niveau d'expression des gènes sélectionnés.

Parmi les différentes fonctions cellulaires examinées, neuf catégories ont retenu notre attention parce qu'elles pouvaient contenir des gènes susceptibles d'être impliqués dans la tolérance au Pb (tab. 9). Il s'agit des catégories fonctionnelles contenant des gènes impliqués dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques, des gènes codant pour des transporteurs, des gènes codant pour des protéines impliquées dans le développement, la réponse hormonale, les réactions Redox et enfin, des gènes impliqués dans la manipulation, la chélation et le stockage des métaux (en anglais « metal handling », en rouge dans le tab. 9). Cette dernière catégorie nous est apparue particulièrement intéressante dans la mesure où elle pouvait être la source de gènes directement impliqués dans la tolérance au Pb.

Tableau 9 : Liste des gènes candidats chez *H. incana*, classés par catégorie fonctionnelle (MapMan), au niveau des parties aériennes (PA) et des racines (R).

Fonction	AGI	Symbole	Annotation	Organe
Transport	AT3G59140	MRP14	Multidrug Resistance associated Protein	PA + R
	AT2G36380	PDR6	Pleiotopic Drug Resistance	PA
	AT5G09930	GCN2	ATP binding cassette sub family F2 (ABCF2)	R
	AT4G33020	ZIP9	ZIP family of metal transporter	PA
	AT1G55010	ZIP11	ZIP family of metal transporter	R
	AT1G15180	DTX13	MATE efflux family protein	R
Stress abiotique	AT5G47560	TDT	Tonoplast Dicarboxylate Transporter	R
	AT3G24080	LEA	Late Embryogenesis Abundant family protein	R
	AT5G66400	RAB18	Responsive to ABA	R
	AT4G38410		Dehydrin	R
	AT4G11650		Osmotin like protein	PA
	AT1G56300	HSP40	HSP40/DnaJ-type molecular chaperone	PA
Stress biotique	AT1G59860	HSP20	Heat Shock Protein	PA
	AT2G15610	PR1	Pathogenesis-Related Protein	R
	AT2G43590		Chitinase-like protein	PA
	AT2G43580		Chitinase-like protein	R
Redox	AT3G32980		Peroxidase	PA
	AT4G08770		Peroxidase	PA
	AT1G71695		Peroxidase	
	AT1G08570		Thioredoxin	R
Développement	AT4G28530	ANAC074	NAC-type transcription factor	PA
	AT2G33480	ANAC041	NAC-type transcription factor	PA
	AT2G46770	ANAC043	NAC-type transcription factor	R
	AT1G32770	ANAC012	NAC-type transcription factor	R
Enzyme	AT1G13090		Cytochrome P450 monooxygenase	PA
	AT3G20080		Cytochrome P450 monooxygenase	PA
	AT1G19630		Cytochrome P450 monooxygenase	PA
	AT3G03470		Cytochrome P450 monooxygenase	PA
	AT1G31800		Cytochrome P450 monooxygenase	R
	AT3G26150		Cytochrome P450 monooxygenase	R
	AT4G37360		Cytochrome P450 monooxygenase	R
	AT5G02790		Glutathione S-transferase	R
	AT1G10370		Glutathione S-transferase	R
	AT5G17220		Glutathione S-transferase	PA
Hormone	AT4G26080	ABI1	PP2C-type protein phosphatase	PA + R
	AT5G57050	ABI2	PP2C-type protein phosphatase	PA + R
	AT1G45249	ABF2	bZIP-type transcription factor	PA + R
	AT1G74520	HVA22a	Abscisic acid-responsive HVA22-type protein	R
	AT4G24960	HVA22d	Abscisic acid-responsive HVA22-type protein	PA
Metal Handling	AT4G39700		Heavy metal transport/detoxification superfamily protein	R
	AT5G17450		Heavy metal transport/detoxification superfamily protein	R
	AT4G08570		Heavy metal transport/detoxification superfamily protein	R
	AT1G22990		Heavy metal transport/detoxification superfamily protein	R
	AT2G28660	CUBD	Chloroplast-targeted copper chaperone protein	R
	AT2G26010	PDF1.3	Plant defensin protein	R
	AT2G26010	PDF1.2b	Plant defensin protein	R
	AT5G01600	FER1	Ferritin 1	PA + R
	AT3G09390	MT2a	Metallothionein	PA
	AT5G02380	MT2b	Metallothionein	PA

Parmi les deux listes de gènes candidats chez *H. incana* (tab. 7 et 8), la catégorie fonctionnelle « metal handling », que nous avons retenue pour la poursuite du travail, comprend dix gènes (tab. 9, en rouge) :

- un gène (At5g01600) codant une protéine de stockage du fer, la ferritine 1 (FER1), sur-exprimé au niveau des parties aériennes et des racines d'*H. incana*,
- deux gènes (At3g09390 et At5g02380) codant pour des métallothionéines, la métallothionéine 2a (MT2a) et la métallothionéine 2b (MT2b), sur-exprimés au niveau des parties aériennes d'*H. incana*,
- un gène (At2g28660) codant pour une protéine chaperonne du cuivre (famille de protéine de liaison au Cu), sur-exprimé au niveau des racines d'*H. incana*,
- deux gènes (At2g26010 et At2g26010) codant pour des défensines (PDF1.3 et PDF1.2b) sur-exprimés au niveau des racines d'*H. incana*,
- quatre gènes (At4g39700, At5g17450, At4g08570 et At1g22990), qui codent pour des protéines contenant un domaine associé aux métaux lourds, sur-exprimés au niveau des racines d'*H. incana*.

Il est intéressant de noter que le gène codant pour une métallothionéine 2a (MT2a) a été retenu dans l'approche « gène candidat » (Chapitre 3, Auguy *et al.*, soumis). Les niveaux d'expression trouvés avec la puce sont en adéquation avec les niveaux d'expression trouvés par QPCR pour ce gène lors de cette étude. De plus, nous avons montré grâce à l'analyse phénotypique du mutant *mt2a*, qu'il semblerait que ce gène soit impliqué dans la tolérance au Pb.

2-3) Analyse fonctionnelle

Afin de valider l'implication de ces gènes dans la tolérance au Pb, nous avons choisi d'utiliser des mutants « knock-out » (KO) d'*Arabidopsis* dans la mesure où la transformation génétique d'*H. incana* n'était pas encore maîtrisée. Chez ces mutants KO, l'expression du gène est éteinte grâce à l'insertion d'un ADN-T. Suite à un traitement au Pb, l'analyse phénotypique des mutants KO va nous permettre de savoir si les phénotypes obtenus sont différents de celui de la lignée sauvage Col-0 cultivée dans les mêmes conditions. Une modification du comportement de la plante mutée sera un signe que le gène concerné est vraisemblablement impliqué dans la tolérance au Pb chez *A. thaliana*. Ne pourront donc être, retenus que les gènes pour lesquels un mutant d'insertion *Arabidopsis* est disponible auprès du « SALK Institute Genomic Analysis Laboratory » (SIGnAL). Ainsi, pour les quatre gènes correspondant aux « Heavy-metal-associated-protein », aucun mutant n'est disponible. De

même, pour les défensines, des mutants sont disponibles uniquement pour le gène (At2g26010, tab. 10) codant pour la défensine PDF1.2b.

En conclusion, parmi les gènes impliqués dans la manipulation, la chélation et le stockage des métaux, n'ont été retenus pour une analyse fonctionnelle que 4 gènes (tab. 10). Ce sont les gènes qui codent pour la métallothionéine (MT2b), pour la ferritine 1 (FER1), pour la protéine de liaison au cuivre (qui sera appelée CUBD) et la défensine (PDF1.2b).

Tableau 10 : Gènes candidats retenus pour une analyse fonctionnelle.

AGI	Annotation GO	Symbole	Fonctions
At2g26020	Défensine de plante 1.2b	PDF1.2b	Activité antifongique, tolérance au Zn
At2g28660	Protéine chaperonne du Cu	CUBD	Liaison et transport de Cu ²⁺
At5g01600	Ferrétine 1	FER1	Homéostasie du Fe
At5g03280	Métallothionéine 2b	MT2b	Distribution des ETMs via le phloème

Pour ces 4 gènes, nous avons confirmé leur niveau d'expression par QPCR, isolé les lignées homozygotes des mutants d'insertion et analysé le phénotype (mesure de la longueur de la racine primaire et de la teneur en Pb) par rapport à la lignée sauvage Col-0. Ensuite, nous avons obtenu la séquence entière de leur ORF (phase ouverte de lecture) chez *H. incana* afin de réaliser la complémentation des mutants d'insertion d'*A. thaliana* correspondants et la sur-expression de ces gènes dans la lignée sauvage Col-0. Enfin, la longueur de la racine primaire et la concentration en Pb des transformants obtenus seront mesurées pour observer, si leur phénotype est différent de celui des mutants dans le cas de la complémentation ou de la lignée sauvage Col-0 dans le cas de la sur-expression des gènes.

2-3-1) Profil d'expression des gènes candidats

L'analyse du profil d'expression, réalisée par QPCR, du gène, *MT2b*, qui code pour une métallothionéine, montre que ce gène est significativement sur-exprimé au niveau des parties aériennes d'*H. incana* par rapport à *A. thaliana*. Par contre, au niveau des racines, il est significativement sur-exprimé chez *A. thaliana* par rapport à *H. incana* (fig. 29). Pour le gène *CUBD*, codant pour la protéine de liaison au cuivre, il est sur-régulé de façon significative au niveau des racines et des parties aériennes d'*H. incana* par rapport *A. thaliana* (fig. 29). Concernant le gène codant pour la ferritine 1 (FER1), son niveau d'expression est équivalent chez les deux espèces au niveau des parties aériennes (environ 3, fig. 29) et *FER1* est sur-exprimé significativement au niveau des parties aériennes d'*H. incana* par rapport à *A. thaliana*. Et enfin, le gène codant pour la défensine (PDF1.2b) est spécifiquement sur-régulé au niveau des racines d'*H. incana*, puisque le niveau d'expression relative est de l'ordre de

289 pour *H. incana* alors qu'il est de l'ordre de 1 pour *A. thaliana* (fig. 29). Au niveau des parties aériennes *PDF1.2b* est significativement sur-régulé chez *H. incana* par rapport à *A. thaliana*.

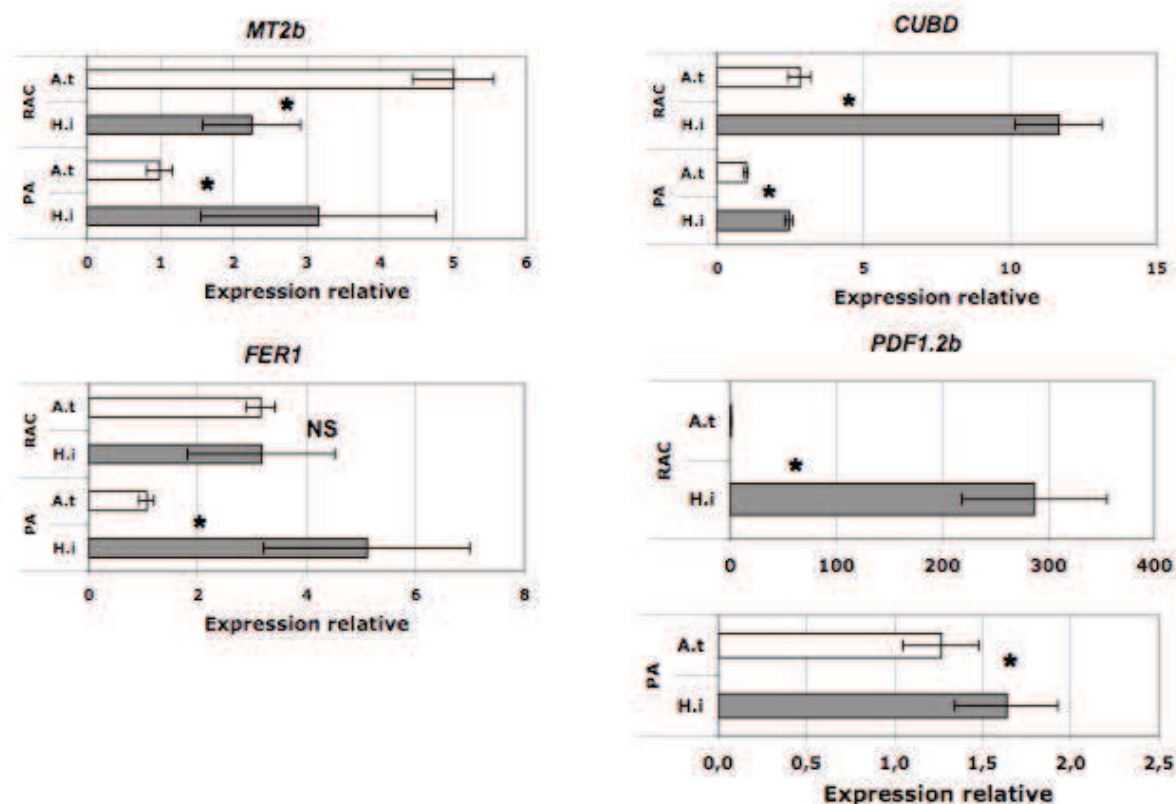


Figure 29 : Expression relative des gènes candidats mesurée par QPCR au niveau des parties aériennes (PA) et des racines (RAC) d'*H. incana* (barre grise) et d'*A. thaliana* (barre blanche). Les plantes sont âgées de 4 semaines et ont été traitées pendant 3 jours avec 100 et 40 μM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ respectivement par rapport à des plantes cultivées pendant la même période sans Pb. Le gène normalisateur utilisé est le gène de la tubuline. Les résultats sont la moyenne de 3 répétitions indépendantes (\pm l'écart type). *, gènes dont l'expression présente une différence significative ; NS, gènes pour les quels la différence d'expression n'est pas significative (p 0,05).

2-3-2) Isolement des ADNc pleine longueur des quatre gènes candidats

Il est nécessaire d'obtenir les séquences complètes des ORFs des gènes candidats afin de réaliser, dans un premier temps, la complémentation des lignées mutantes d'*A. thaliana* avec les ADNc d'*H. incana* correspondants, puis, dans un second temps, la sur-expression de ces gènes dans la lignée sauvage Col-0. Si les gènes d'*H. incana* et d'*A. thaliana* ont la même fonction, la transformation génétique des mutants d'*A. thaliana* avec les ADNc d'*H. incana* devrait restaurer le phénotype sauvage. Si les gènes candidats d'*H. incana* sont impliqués dans la tolérance au Pb, leur sur-expression dans *A. thaliana* devrait augmenter la tolérance au Pb de ce dernier. Pour cela, chaque ORF sera clonée dans un vecteur d'expression sous le

contrôle du promoteur 35S qui va permettre la sur-expression du gène après transformation, via *Agrobacterium*, d'*A.thaliana* Col-0 ou la complémentation du gène après transformation des lignées mutantes.

Pour les gènes *FER1* et *MT2b*, l'ORF a été obtenue directement après amplification de l'ADN d'*H. incana* avec des amorces correspondants à l'ORF d'*A. thaliana*.

Pour les deux gènes restants, *CUBD* et *PDF1.2b*, une partie de l'ADNc a été obtenue à partir de l'amplification de l'ADN d'*H. incana* correspondant aux gènes orthologues chez *A. thaliana*. Pour le gène *PDF1.2b*, c'est une séquence de 214 bp qui a été obtenue après PCR mais, malheureusement, la RACE-PCR n'a pas permis d'amplifier le fragment d'environ 34 bp qui manquait en 3'. Une séquence de 702 bp a été obtenue pour le gène *CUBD*, puis une RACE-PCR a été réalisée en 3' à partir de cette séquence pour obtenir une ORF de 798 bp.

La description des séquences et leurs numéros d'accès sont donnés dans le tableau 11.

Tableau 11 : Caractérisation des séquences ORF des gènes candidats. Le score, la *evalue* et le % d'identité sont le résultat du blastn obtenu avec les séquences d'*A. thaliana*. (*) Séquence incomplète.

Symbole	N°Accession	Taille ORF (bp)	Score	<i>evalue</i>	Identité (%)
<i>PDF1-2b</i>	JX863665	214(*)	248	1 e ⁻⁶²	88
<i>CUBD</i>	JX863662	798	747	0,0	87
<i>FER1</i>	JX863663	771	878	0,0	84
<i>MT2b</i>	JX863664	243	259	6e ⁻⁶⁶	87

2-3-3) Complémentation et sur-expression des gènes

Pour les trois gènes dont on dispose de la séquence complète de l'ORF, c'est-à-dire *MT2b*, *FER1* et *CUBD*, un clonage dans un vecteur d'expression (pCB406 ou pCB2004) a été réalisé en utilisant la technique Gateway (Invitrogen). Au niveau de ces vecteurs d'expression, l'ORF est sous le contrôle d'un promoteur 35S. Pour chaque gène, deux transformations indépendantes ont été réalisées ; l'une à partir de la lignée sauvage Col-0 et l'autre à partir de la lignée mutante correspondant au gène transformé. Un contrôle de transformation avec un vecteur vide est réalisé pour la lignée Col-0 et pour chacune des lignées mutantes.

Une fois à maturité, les graines ont été récoltées et semées sur du terreau. Les plantules transformées ont été sélectionnées sur leur résistance au glufosinate. La sélection des transformants est en cours de réalisation. Concernant les deux lignées mutantes du gène

MT2b (N537601 et N644899), deux transformants de la lignée mutante (complémentation) ont été sélectionnés. De même, pour la lignée mutante du gène *CUBD*, N589210, un transformant de la lignée mutante (complémentation) a été obtenu. Les autres lignées sont en cours de sélection.

En effet, la fin de mon expatriation au Maroc ne m'a pas permis de finaliser cette étude. La concentration en Pb dans les parties aériennes et les racines et ainsi que la longueur de la racine primaire en présence de Pb seront mesurées ultérieurement sur ces transformants.

2-3-4) Analyse phénotypique des mutants d'insertion d'*A. thaliana*

Les mutants d'insertion d'*A. thaliana* ont été choisis selon la position de l'insertion de l'ADN-T dans le gène dont on a choisi d'étudier l'extinction de l'expression. L'insertion peut être située dans la partie codante du gène, dans la partie 5' non codante ou plus en amont. Deux lignées de mutants ont été obtenues pour chacun des gènes *PDF1.2b* et *MT2b* et une seule lignée mutante pour chacun des 2 autres gènes *CUBD* et *FER1* (tab. 12).

Tableau 12 : Insertions et lignées mutantes correspondant aux gènes candidats (NASC : Nottingham Arabidopsis Stock Centre).

Gène	Symbole	Insertion	Lignée (NASC)
At2g26020	<i>PDF1.2b</i>	SALK_086302/SALK_086304	N586302/N586304
At2g28660	<i>CUBD</i>	SALK_089210	N589210
At5g01600	<i>FER1</i>	SALK_055487	N555487
At5g02380	<i>MT2b</i>	SALK_144899/SALK_037601	N644899/N537601

Concernant les lignées mutantes *pdf1.2b_1* (SALK_086302), *pdf1.2b_2* (SALK_086304) et *mt2b_1* (SALK_144899), les insertions sont situées en amont du gène, probablement dans les régions promotrices des gènes correspondants (fig. 30). Pour la lignée mutante *mt2b.2* (SALK_037601), l'insertion est située dans la région 5' non traduite du gène. Pour la lignée mutante *cubd* (SALK_089210), l'insertion se situe, dans le gène, au niveau du troisième exon et, pour le mutant *fer1* (SALK_055487), au niveau du deuxième exon (fig. 30).

La présence de l'insertion a été vérifiée, sur les ADN de plantules issues des lignées SALK, par PCR en utilisant une amorce spécifique de l'insertion (Lbb1) et 2 amorces spécifiques du gène, situées de part et d'autre de l'insertion. Pour chaque lignée, trois PCR ont été réalisées : une PCR « gène-gène » avec les 2 amorces spécifiques du gène, une PCR avec l'amorce spécifique de l'insertion et l'amorce spécifique du gène située en amont et une

PCR avec l'amorce spécifique de l'insertion et l'amorce spécifique du gène située en aval. Dix à vingt plantules ont été testées par lignée d'insertion et une lignée a été sélectionnée pour laquelle il n'y avait pas d'amplification pour la PCR « gène-gène » (preuve de la présence de l'insertion et de la disruption du gène) et une amplification avec l'une des deux autres PCR (preuve de la présence de l'insertion). Les expérimentations suivantes ont été réalisées sur des plantules à partir des graines issues de cette lignée homozygote pour l'insertion.

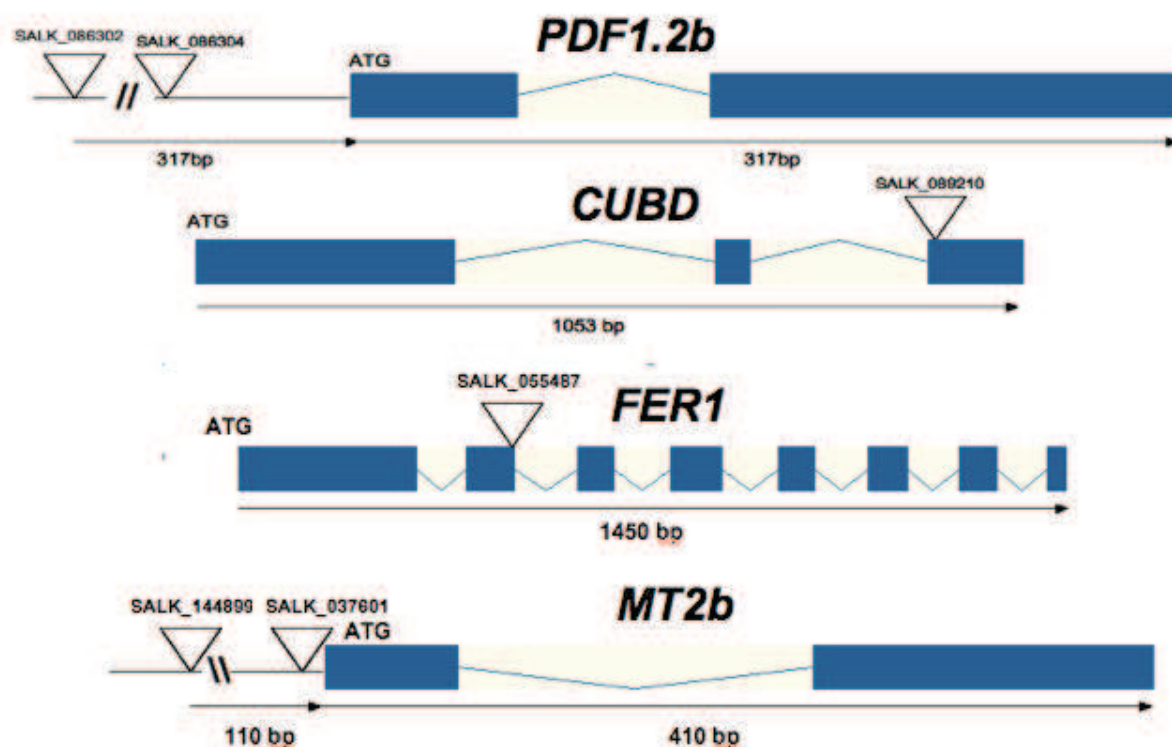


Figure 30 : Localisation de l'insertion des ADN-T dans les lignées mutantes d'Arabidopsis. Rectangle bleu : exon, rectangle jaune avec trait bleu : intron. *PDF1.2b* : At2g26020 ; *CUBD* : At2g28660 ; *FER1* : At5g01600 et *MT2b* : At5g02380.

- Mesure de la longueur de la racine primaire

Pour chaque lignée mutante, la mesure de la longueur de la racine primaire a été réalisée sur des plantules d'Arabidopsis, cultivées pendant treize jours sur un milieu gélosé contenant ou pas 40 μM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. La lignée sauvage, Col-0, est cultivée dans les mêmes conditions en parallèle (fig. 31). Il n'y a pas de différence significative de la longueur de la racine primaire entre la lignée sauvage Col-0 et les lignées mutantes lorsque celles-ci sont cultivées en absence de Pb. Par contre, lorsque les plantules sont traitées au Pb, les lignées mutantes *mt2b_1*, *mt2b_2* et *pdf1.2b_1* présentent une augmentation significative de la longueur de la racine primaire par rapport à la lignée sauvage Col-0. Cette augmentation est

de l'ordre de 17% pour la lignée mutante *mt2b.2* et de 30% pour les lignées mutantes *mt2b_1* et *pdf1.2b_1*, par rapport à la lignée sauvage Col-0.

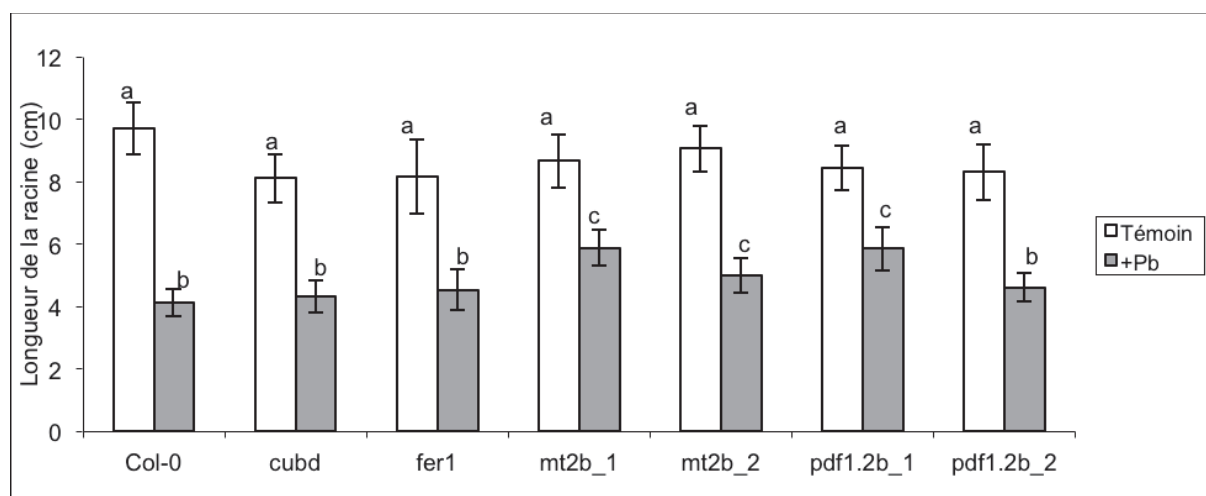


Figure 31 : Effets du Pb sur la longueur de la racine primaire chez des plantules d'*A. thaliana* de la lignée sauvage et des lignées mutantes. Les plantules ont été cultivées à la verticale pendant 13 jours sur du milieu gélosé avec ou sans 40 μ M de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. Les résultats sont la valeur moyenne de 40 plantules (\pm l'écart type). *col-0*, lignée sauvage, *cubd*, lignée N589210, *fer1*, lignée N555487, *mt2b_1*, lignée N644899, *mt2b_2*, lignée N537601, *pdf1.2b_1*, lignée N586302, *pdf1.2b_2*, lignée N586304. Les lettres représentent un groupe statistiquement homogène (p 0,05).

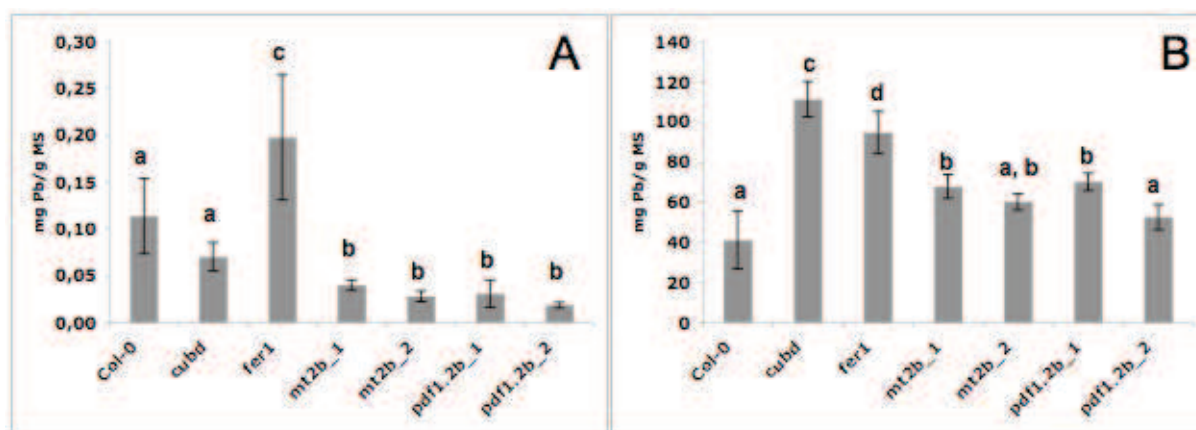


Figure 32 : Teneurs en Pb dans les parties aériennes (A) et les racines (B) de plantules d'*A. thaliana* âgées de 4 semaines et traitées pendant 10 jours avec 40 μ M de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ en culture hydroponique. Les résultats sont la moyenne de 3 répétitions indépendantes (\pm l'écart type). *cubd*, lignée N589210, *fer1*, lignée N555487, *mt2b_1*, lignée N644899, *mt2b_2*, lignée N537601, *pdf1.2b_1*, lignée N586302, *pdf1.2b_2*, lignée N586304. Les lettres représentent un groupe statistiquement homogène (p 0,05).

- Mesure de la concentration en Pb

Pour chaque lignée mutante, la teneur en Pb a été mesurée au niveau des parties aériennes (fig. 32A) et des racines (fig. 32B) de plantules âgées de 4 semaines après 10 jours de culture en hydroponie en présence de 40 μM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. La teneur en Pb des lignées mutantes est comparée avec celle de la lignée sauvage Col-0 ayant subi le même traitement.

Au niveau des parties aériennes, la teneur en Pb est significativement différente pour les lignées *mt2b_1*, *mt2b_2*, *pdf1.2b_1* et *pdf1.2b_2* par rapport à la lignée sauvage Col-0 (fig. 32A). En effet, la teneur en Pb au niveau des parties aériennes de ces lignées mutantes est diminuée, par rapport à la teneur en Pb de la lignée sauvage Col-0, de 65% pour *mt2b_1*, de 75% pour *mt2b_2*, de 73% *pdf1.2b_1* et de 83% *pdf1.2b_2*. Cette teneur est également significativement différente pour la lignée *fer1* mais avec, cette fois, une augmentation de 42% de la teneur en Pb par rapport à la lignée sauvage Col-0. Par contre, la lignée mutante, *cubd* ne présente pas de différence significative avec la lignée Col-0.

Au niveau des racines, la teneur en Pb est significativement différente pour les lignées mutantes *cubd*, *fer1*, *mt2b_1* et *pdf1.2b_1* avec une augmentation de la teneur en Pb de 63%, de 57%, de 39% et de 41% respectivement, par rapport à la lignée sauvage Col-0. La teneur en Pb n'est pas significativement différente de celle de la lignée Col-0 pour les deux lignées mutantes *mt2b_2* et *pdf1.2b_2*, bien que l'augmentation de la teneur en Pb pour ces lignées soit de 32% et de 22% respectivement.

3) Discussion

L'objectif de cette étude est d'identifier des gènes qui seraient impliqués dans la tolérance au Pb. La méthode retenue a été de comparer les transcriptomes de ces deux plantes mais comme nous ne disposons d'aucune donnée moléculaire pour *H. incana* et que ces deux espèces sont génétiquement proches, nous avons utilisé une puce à ADN d'*A. thaliana* pour réaliser le transcriptome d'*H. incana*. Nous avons fait le choix de ne conserver pour *H. incana* que les données d'expression différentielles de celles d'*A. thaliana*. C'est-à-dire, les gènes qui étaient spécifiquement exprimés chez *H. incana* lors d'une exposition au Pb et, parmi les gènes communs aux deux espèces, ceux qui avaient un ratio FC Hi/FC At > 2 . Cela nous a permis d'éliminer tous les gènes communs aux deux espèces qui avaient le même niveau d'expression chez la plante tolérante et la plante sensible. Le postulat étant que les gènes intervenant dans la tolérance aux ETMs toxiques seraient des gènes impliqués dans différents mécanismes tels que l'homéostasie des ETMs essentiels, les réactions de défense contre

d'autres stress biotique et/ou abiotique et qu'ils seraient mobilisés pour détoxifier le Pb chez une plante tolérante alors qu'ils ne le seraient pas chez une plante sensible. Cette stratégie nous a permis d'obtenir une liste de quelques centaines de gènes candidats (tab. 7 et 8). Cette liste a été affinée en s'appuyant sur les données d'expression d'*A. thaliana* pour pouvoir réaliser une analyse fonctionnelle sur un nombre plus restreint de gènes (tab. 9 et 10).

3-1) La méthodologie adoptée a-t-elle permis d'identifier des gènes impliqués dans la tolérance au Pb?

La méthode d'hybridation croisée entre espèces, appliquée aux puces à ADN, a permis de mettre en évidence des gènes impliqués dans la tolérance au Zn et au Cd (Weber *et al.*, 2004 ; Weber *et al.*, 2006; Becher *et al.*, 2004, Van de Mortel *et al.*, 2006 ; Talke *et al.*, 2006). D'autres méthodes sont disponibles pour identifier des gènes ou des protéines.

Nous aurions pu utiliser, par exemple, la méthode « SSH » (suppression subtractive hybridization) pour identifier des gènes d'*H. incana* impliqués dans la tolérance au Pb. Elle a été utilisée pour identifier des gènes impliqués dans la tolérance au Cd, Al, Cs et au Pb (Louie *et al.*, 2003 ; Watt, 2003 ; Sahr *et al.*, 2004 et Srivastava *et al.*, 2007). Toutefois, aucune de ces études ne fait une comparaison avec les gènes induits par ces ETMs chez une espèce sensible.

Une autre approche permet de s'affranchir des régulations post- transcriptionnelles des ARNm, c'est l'étude du protéome. Des études du protéome ont été réalisées, ces dernières années, en réponse à des ETMs, et ont permis de mettre en évidence des protéines impliquées dans la réponse au stress oxydatif, la signalisation, l'assimilation du CO₂ et la réponse au stress (pour revue Ahsan *et al.*, 2009). Toutefois, ces approches n'ont pas permis de mettre en évidence des transporteurs membranaires (Komatsu *et al.*, 2007). La réalisation d'un protéome membranaire, par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (2D-LC-MS/MS), est lourde à mettre en œuvre et n'aurait pas pu être réalisé au Maroc.

Toutefois, un des inconvénients majeurs de l'hybridation croisée est la perte d'information due au fait, que si une séquence d'*H. incana* est trop différente de la séquence de la sonde d'*A. thaliana*, il n'y aura pas hybridation. Plus les espèces sont éloignées génétiquement et plus la perte d'information risque d'être importante. Les espèces *A. halleri* et *A. thaliana* ont 94% d'identité au niveau des séquences codantes et le pourcentage d'hybridation de la puce correspondante est de 36,8% (Becher *et al.*, 2004). Alors qu'*H.*

incana et *A. thaliana* présentent un pourcentage d'identité au niveau des séquences codantes plus faible (89%) et nous avons trouvé 24 et 27 % d'hybridation au niveau des parties aériennes et des racines respectivement. Cette différence pourrait s'expliquer par un plus faible niveau d'hybridation croisée.

Il faut noter, aussi, que seulement 2% des gènes sont régulés par le Pb au niveau des parties aériennes d'*A. thaliana* alors qu'ils sont 31% au niveau des racines. La réponse d'*A. thaliana* au Pb, après 3 jours de traitement, semble localisée au niveau des racines. De plus, si l'on regarde le FC le plus élevé au niveau des parties aériennes d'*A. thaliana*, il n'est que de 5,15 alors qu'il peut atteindre 233 pour le gène le plus sur-exprimé au niveau des racines. L'amplitude de réponse est nettement plus réduite dans les parties aériennes que dans les racines. Ce résultat est à rapprocher des teneurs en Pb dans les parties aériennes des plantules d'*A. thaliana* traitées pendant 3 jours avec 40 μ M de Pb qui sont quasiment nulles (0,006 mg/g de MS ; tab. 4). Alors que pour *H. incana* la part des gènes régulés par le Pb est de l'ordre de 50% que ce soit au niveau des racines ou des parties aériennes, l'amplitude de la réaction est aussi équivalente au niveau des parties aériennes et des racines (FC maximum de 66 et de 50 respectivement). La teneur en Pb au niveau des parties aériennes d'*H. incana* est beaucoup plus élevée que pour *A. thaliana* (0,346 mg/g de MS, tab. 4). Cette différence de réponse pourrait être celle d'une plante sensible, où le Pb n'atteint pas les parties aériennes, mais reste accumulé au niveau des racines, par rapport à une plante tolérante où le Pb est transloqué des racines vers les parties aériennes et où un certain nombre de mécanismes (chélation, stockage) vont être mis en place.

Un autre point important est que les données d'expression, même si elles sont partielles pour *H. incana*, ont été validées en utilisant une autre méthode. La corrélation entre les deux méthodes de mesure (puces ADN et QPCR) de l'expression des gènes est forte et, par conséquent, valide le choix de la puce hétérologue *H. incana/A. thaliana*.

La méthodologie adoptée nous a permis d'obtenir une liste de gènes candidats susceptibles d'être impliqués dans la tolérance au Pb chez *H. incana*.

3-2) La liste des gènes candidats contient-elle des gènes impliqués dans la tolérance au Pb ?

La liste des gènes candidats, obtenue à l'aide du logiciel MapMan (tab. 9), met en évidence plusieurs familles de gènes qui pourraient être impliqués dans les mécanismes de tolérance au Pb. Certains de ces gènes sont impliqués dans la réponse à des stress abiotiques, biotiques et oxydatifs. D'autres gènes, par analogie avec les résultats obtenus dans la

littérature pour d'autres ETMs (Zn, Cd ...), sont impliqués dans le transport des molécules (entrée dans la cellule, translocation ou stockage), ou dans des mécanismes sous-jacents comme la réponse hormonale, le développement de la plante ou des réactions enzymatiques. Enfin, les gènes impliqués dans la manipulation des ETMs (metal handling) sont des candidats de choix pour leur implication dans la tolérance au Pb chez *H. incana*.

3-2-1) Gènes impliqués dans la réponse aux stress

En raison de leur mode de vie sessile, les plantes sont exposées à une variété de contraintes et doivent développer des mécanismes complexes pour éviter ou faire face aux conséquences des stress extrêmes. Les génomes végétaux ont donc évolué pour répondre aux défis environnementaux et de nombreux gènes sont dédiés aux mécanismes de protection vis-à-vis de ces stress. Les exemples de facteurs environnementaux extrêmes sont la sécheresse, la salinité, le rayonnement solaire (excès de lumière ou fortes intensités lumineuses, les UV), les températures extrêmes (chaleur, basse température et stress de congélation) et les polluants (herbicides, pesticides) avec, parmi ceux-ci, les ETMs.

Des mécanismes de protection font intervenir des protéines impliquées dans la détoxification (SOD, peroxydase), l'osmoprotection (proline, sucres polyols), les mouvements de l'eau et des ions (aquaporines et transporteurs d'ions). Ces protéines ont généralement des fonctions de chaperonne (Vinocur & Altman, 2005).

Ainsi, un certain nombre de gènes impliqués dans les mécanismes de résistance aux stress sont présents dans la liste des gènes candidats (tab. 9). Trois gènes, codant pour des protéines appartenant à la famille des LEA (Late Embryogenesis Abundant family protein), sont sur-exprimés spécifiquement au niveau des racines (At3g24080 par un facteur 24, At5g66400 par un facteur 19 et At4g38410 par un facteur 3). La présence de protéines de type LEA a souvent été associée à la tolérance des cellules à la déshydratation induite, par exemple, par le gel, une forte salinité ou la sécheresse (Hinch & Thalhhammer, 2012). Dans le cas d'un stress associé à une exposition au Pb, ces protéines pourraient se lier aux ions métalliques et augmenteraient ainsi la tolérance aux ETMs en limitant la peroxydation des lipides et en augmentant la stabilité des membranes (Alsheikh *et al.*, 2003 ; Xu *et al.*, 2008). Il a également été montré que certaines déhydrines pouvaient avoir aussi un rôle dans le transport longue distance des micro-éléments via le phloème (Krüger *et al.*, 2002). Ces protéines de type LEA pourraient donc jouer un rôle prépondérant dans la tolérance au Pb chez *H. incana*.

Au niveau des parties aériennes, on observe la sur-expression d'un gène codant pour une osmotine (At4g11650 ; tab. 8). Les osmotines sont de petites protéines protectrices qui

répondent à l'ABA et à l'éthylène, ainsi qu'à de nombreux stress biotiques et abiotiques (Liu *et al.*, 1995).

Deux gènes (At1g56300 et At1g59860 ; tab. 7), codant pour des HSP (Heat Shock Protein), présentent une sur-expression au niveau des parties aériennes. D'une façon générale, ces protéines HSP jouent un rôle important dans l'homéostasie des protéines et se retrouvent dans tous les compartiments cellulaires. De nombreux stress dont l'exposition aux ETMs peuvent induire ces protéines (Gupta *et al.*, 2010). Les HSP, qui ont un rôle de chaperonne, pourraient rétablir l'homéostasie des protéines endommagées par le Pb.

Les protéines de la famille des PR (Pathogenesis related) sont induites par des stress biotiques (infections bactériennes ou virales) mais aussi par des stress abiotiques comme la lumière UV ou la salinité (Didierjean *et al.*, 1996). Parmi les gènes induits par une exposition au Pb codant pour des protéines PR, on retrouve deux gènes codant pour des chitinases, un au niveau des parties aériennes (At2g43590) et un au niveau des racines (At2g43580). Les chitinases seraient impliquées dans la réponse aux ETMs et pourraient même faire partie des composants qui seraient responsables de la variation intra- et inter-spécifiques de la tolérance aux ETMs (Békésiova *et al.*, 2008). Un gène codant pour une protéine PR1 est également très fortement sur-exprimé au niveau des racines d'*H. incana* (At2g14610, par un facteur 16). Une étude récente a montré que, lorsqu'un gène de poivrier codant pour une protéine PR1 était sur-exprimé dans le tabac, il augmentait significativement la tolérance au Cd et à l'Hg (Sarowar *et al.*, 2005).

Le plomb induit la production de ROS (Reactive Oxygen Species ; Reddy *et al.*, 2005 ; Huang *et al.*, 2012), ce qui va déclencher un mécanisme de défense anti-oxydative. Un certain nombre d'enzymes sont impliquées dans ce mécanisme, telles que les superoxydes dismutases, les peroxydases, les catalases et les thiorédoxines. Trois gènes codant pour des peroxydases se trouvent dans la liste des gènes candidats (tab 7 et 8). Deux de ces gènes sont sur-régulés au niveau des parties aériennes (At3g32980 et At4g08770, par un facteur 5), et un autre est sur-exprimé au niveau des racines (At1g71695, par un facteur 2). Un gène codant pour une thiorédoxine (At1g08570) est également induit par un facteur 2 au niveau des racines. Il y a peu de gènes régulés différemment chez *H. incana* par rapport à *A. thaliana* appartenant à ce mécanisme de défense. Par contre, au niveau des gènes induits au niveau des racines et communs entre les deux espèces, on retrouve deux catalases (At1g20260, At1g20630), deux glutarédoxines (At5g11930, At4g33040), deux peroxydases (At4g08770, At1G68850) et une SOD (At4g33040). Les mécanismes de défense anti-oxydative par la voie enzymatique ne semblent pas être déterminants dans la différence de réponse entre l'espèce

tolérante au Pb *H. incana* et l'espèce non-tolérante *A. thaliana*. Ce serait peut être la voie non-enzymatique mettant en jeu le glutathion ou les métallothionéines qui serait impliqué dans la tolérance au Pb chez *H. incana* (Hassinen *et al.*, 2011).

3-2-2) Gènes impliqués dans le transport des ETMs

L'analyse des tableaux 7 et 8 montre que de nombreux gènes qui codent pour des transporteurs sont induits au niveau des parties aériennes et des racines d'*H. incana*. Par analogie avec les transporteurs d'ETMs décrits dans la littérature, huit gènes pourraient être impliqués dans le transport du Pb chez *H. incana* (tab. 9).

Les ABC transporteurs de la famille MRP (multidrug resistance associated protein) sont situés au niveau du tonoplaste et sont impliqués dans la séquestration de composés formés avec le glutathion (Martinoia *et al.*, 2002). Une étude, menée par Tommasini *et al.* (1998), a montré qu'en complétant la lignée de levure mutante *ycf1*, sensible au Cd, par le gène *AtMRP3*, il pouvait restaurer le phénotype sauvage. De plus, il a été montré que le gène *MRP3* était sur-exprimé dans des plants d'*A. thaliana* exposés au Cd (Bovet *et al.*, 2003) et qu'il était impliqué dans le stockage de celui-ci sous la forme d'un conjugué Cd-phytochélatine ou Cd-glutathion (Bovet *et al.*, 2005). Par ailleurs, il est intéressant de noter que le promoteur de ce gène est également activé par le Pb (Zientara *et al.*, 2009). On peut imaginer un rôle similaire pour le transporteur MRP14, codé par le gène *At3g59140* qui est sur-exprimé au niveau des parties aériennes et des racines d'*H. incana*. Le gène codant pour la phytochélatine synthétase n'étant pas induit par le Pb (Auguy *et al.*, soumis ; chapitre 3), le transporteur MRP14 pourrait être impliqué dans le stockage du Pb dans les vacuoles sous la forme d'un conjugué Pb-Glutathion plutôt que sous la forme du complexe Pb-Phytochélatine.

Les ABC transporteurs de la famille PDR (pleiotopic drug resistance) sont localisés au niveau de la membrane plasmique et seraient impliqués dans l'efflux de substances cytotoxiques (Balzi & Goffeau, 1994). Il a été montré, par génétique inverse, que le transporteur PDR 12 était impliqué dans la tolérance au Pb chez *A. thaliana* (Lee *et al.*, 2005). PDR8, un autre transporteur de la même famille, a été caractérisé comme étant un transporteur d'efflux de Cd (Kim *et al.*, 2007). Chez *H. incana*, le gène codant pour le transporteur PDR6 (*At2g36380*) est sur-exprimé au niveau des feuilles, il pourrait jouer un rôle dans la détoxification du Pb si on prend en compte sa fonction de transporteur d'efflux.

Parmi la liste de gènes candidats (tab.10), on retrouve également deux transporteurs qui appartiennent à la famille des ZIP (Zinc and Iron regulated transporters Protein). Il s'agit de gènes orthologues de *ZIP9* (*At4g33020*) et de *ZIP11* (*At1g55910*) qui sont sur-régulés au

niveau des parties aériennes et des racines respectivement. Les gènes de la famille ZIP codent pour des transporteurs qui sont impliqués dans le transport du Fe, du Mg et du Zn (Guerinot, 2000). Des études ont montré qu'ils étaient aussi impliqués dans le transport du Cd chez la plante hyperaccumulatrice *A. halleri* (Becher *et al.*, 2004 ; Weber *et al.*, 2004) et chez la plante hyperaccumulatrice *N. caerulescens* (Lombi *et al.*, 2002). Etant donné que le gène *ZIP11* est sur-exprimé au niveau des racines, le transporteur ZIP11 pourrait être impliqué dans l'adsorption du Pb et comme le gène *ZIP9* est sur-exprimé au niveau des parties aériennes, le transporteur ZIP9 pourrait être plutôt impliqué dans le déchargement du xylème chez *H. incana*.

Parmi les gènes impliqués dans le transport, le gène At1g15180, identifié comme faisant partie des gènes codant des protéines de la famille des MATE (Multidrug and toxin efflux family), est sur-exprimé au niveau des racines de *H. incana*. Le gène FRD3, qui fait également partie de cette famille de transporteurs, est induit chez les plantes hyperaccumulatrices telles qu'*A. halleri* et *N. caerulescens* (Talke *et al.*, 2006 ; Van de Mortel *et al.*, 2006) et serait impliqué dans la translocation du Fe (Durrett *et al.*, 2003). Par analogie avec la fonction de FRD3, le gène At1g1518 pourrait être impliqué, chez *H. incana*, dans la translocation du Pb des racines vers les parties aériennes.

Enfin, le gène codant pour le transporteur TDT (Tonoplaste Dicarboxylate Transporter ; At5g47560) est induit au niveau des racines d'*H. incana*. Ce gène code pour une protéine tonoplastique impliquée dans le transport de l'acide malique vers la vacuole (Kovermann *et al.*, 2007) et, par ailleurs, l'acide malique est également un ligand des ETMs (Haydon & Cobbett, 2007). On peut donc supposer que ce transporteur pourrait être impliqué dans le stockage du Pb dans la vacuole.

3-2-3) Gènes impliqués dans des mécanismes sous-jacents

Parmi les gènes impliqués dans le développement de la plante, se trouvent des facteurs de transcription appartenant à la famille des NAC [pour NAM (No apical meristem), ATAF (Arabidopsis transcription activation factor), CUC (Cup-shaped cotyledon)]. Ces gènes NAC sont spécifiques des plantes où ils sont très nombreux (une centaine chez *A. thaliana*). Ils sont impliqués dans le développement de la plante, les réactions de défense et les réponses au stress abiotique (Olsen *et al.*, 2005). Deux gènes de cette famille sont induits au niveau des parties aériennes chez *H. incana* : ANAC074 (At4g28530 ; par un facteur de 5) et ANAC041 (At2g33480 ; par un facteur de 3). Deux autres sont également sur-régulés au niveau des racines : ANAC043 (At2g46770, par un facteur 4) et ANAC012 (At1g32770, par un facteur

6) chez *H. incana* en réponse au Pb. Contrairement à ce qui a été trouvé chez *A. thaliana*, où un gène codant pour un facteur de transcription ANAC est sous-exprimé en réponse à l'arsenic (Abercrombie *et al.*, 2008), chez *H. incana*, ces facteurs de transcription pourraient être impliqués dans la sur-expression du gène *FER1* (At5g01600 ; par un facteur 2,5 au niveau des parties aériennes et par un facteur 4 au niveau des racines) puisque l'expression de cette protéine est NAC-dépendante (Tran *et al.*, 2004).

Dans la catégorie fonctionnelle «enzyme» (tab. 9), se trouvent de nombreux gènes qui codent pour des cytochromes P450 (CYP). En effet, quatre gènes codant pour des CYP sont induits au niveau des parties aériennes : At1g13090, At3g20080 et At1g19630 par facteur 2,5 et At3g03470 par un facteur 24 sous l'effet de l'exposition au Pb (tab. 7). Trois gènes de cette famille sont également sur-régulés au niveau des racines : At1g31800 par un facteur 2, At3g26150 et At4g37360 par un facteur 3 (tab. 8). Cette grande famille (286 gènes chez *A. thaliana*) code pour des protéines contenant un hème et qui catalysent différentes réactions d'oxydation chez les plantes comme la détoxification des herbicides (Donaldson & Luster, 1991 ; Hatzios, 1991). CYP71B6 est ainsi induit par le cuivre chez *A. thaliana* (Narasuka *et al.*, 2004). Les CYP, qui sont induits par les ROS, pourraient participer à la détoxification du Pb.

Deux gènes codant pour des glutathion-S transférases (GSTs) sont sur-régulés au niveau des racines (At5g02790 et At1g10370 par un facteur 2) et un au niveau des parties aériennes (At5g17220 par un facteur 3). Les GSTs pourraient également intervenir dans la détoxification du Pb. En effet, cette enzyme catalyse, entre autres, la formation d'un conjugué entre le glutathion et un ETM qui est une étape clé de la détoxification (Frova, 2003). Cette réaction se déroule en plusieurs phases. La première phase fait intervenir les CYP qui vont réaliser l'oxydation des ETMs, ensuite la deuxième phase consiste à la conjugaison de l'ETM avec le glutathion et enfin la troisième phase à la séquestration du conjugué dans la vacuole (Bovet *et al.*, 2003 et 2005). L'induction des cytochromes P450 et des glutathion-S transférases pourraient participer au mécanisme de détoxification du Pb chez *H. incana*.

Un traitement au Pb va induire une accumulation d'ABA au niveau des feuilles (Parys *et al.*, 1998). Cette accumulation d'ABA se traduit par une fermeture des stomates via une voie de signalisation qui fait intervenir des récepteurs de l'ABA (de type PYR), des phosphatases de type 2C (ABI1 et ABI2) et trois protéines kinases (OST1, GHR1 et SNAC1 ; Hua *et al.*, 2012). Les gènes codant pour les phosphatases de type 2C, ABI1 (At4g26080) et ABI2 (At5g57050) sont sur-exprimés en présence de Pb, ainsi qu'un gène codant pour un facteur de transcription qui interagit avec l'ABA (ABF2, At1g45249). ABF2 pourrait être

aussi impliqué dans la fermeture des stomates et il serait impliqué dans la tolérance à différents stress abiotiques (Kim *et al.*, 2004). Des gènes qui codent pour des protéines inductibles par l'ABA mais aussi par des stress (At1g74520 et At4g24960) sont aussi sur-exprimés. Cette réponse hormonale liée à l'accumulation d'ABA dans la cellule pourrait participer chez *H. incana* à la tolérance au Pb.

3-2-4) Gènes impliqués dans la manipulation des ETMs

Se retrouvent dans la catégorie « metal handling », dix gènes pouvant être impliqués dans le transport, la chélation et le stockage des métaux (tab. 9).

Quatre gènes codant pour des protéines impliquées dans le transport des ETMs sont sur-régulés au niveau des racines (At4g39700, At5g17450, At1g22990 et At4g08570). La fonction des deux premières métallochaperonnes est inconnue, les deux autres sont impliquées dans la tolérance au Cd (Tehseen *et al.*, 2010). Ces métallochaperonnes pourraient intervenir dans la détoxification de la cellule en se liant au Pb. Un gène (At2g28660), codant pour une protéine (CUBD) qui possède un putatif domaine d'adressage chloroplastique et un domaine de fixation aux métaux lourds de type Cys-x-x-Cys (Abdel-Ghani *et al.*, 2005), est induit par un facteur 6 au niveau des racines (tab. 8). Cette protéine est une protéine chloroplastique chaperonne du Cu et pourrait intervenir dans la détoxification du Pb en se liant à celui-ci.

Deux autres gènes sont fortement sur-régulés au niveau des racines, il s'agit des gènes codant pour les défensines PDF1.3 (At2g26010, par un facteur 51) et PFD1.2B (At2g26020, par un facteur 39). Ces protéines sont des protéines de réponse au stress biotique mais sont également impliquées dans la tolérance au Zn chez *A. halleri* (Mirouze *et al.*, 2006). Elles sont aussi fortement exprimées chez *N. caerulea* par rapport à *A. thaliana* en réponse au Zn (Van de Mortel *et al.*, 2006). Les défensines pourraient participer à la tolérance au Zn en se liant directement au Zn ou en interagissant avec des transporteurs membranaires (Mirouze *et al.*, 2006). Dans notre cas, ces gènes auraient pu être sur-régulés en réponse à un pathogène mais les plantes, traitées et non-traitées au Pb, ont été cultivées dans les mêmes conditions. Donc, si les gènes *PDF1.2b* et *PDF1.3* étaient induits en réponse à un pathogène chez *H. incana*, il devrait y avoir la même réponse chez *A. thaliana*, ce qui n'est pas le cas. Ces défensines, spécifiquement exprimés au niveau des racines chez *H. incana*, pourraient soit chélater le Pb au niveau des organites, soit interagir avec des transporteurs membranaires.

Un seul gène est sur-régulé au niveau de racines et des parties aériennes, il s'agit du gène codant pour une ferritine (FER1, At5g01600). Cette protéine est impliquée dans la

détoxification du Fe, en cas d'excès, et dans son stockage au niveau des plastes (Palmer *et al.*, 2009). Ce gène est sur-exprimé par un excès de Zn chez *A. halleri* et *N. caerulea* (Talke *et al.*, 2006 ; Van de Mortel *et al.*, 2006). FER1 pourrait jouer un rôle dans la tolérance au Pb en se liant au Pb²⁺ au niveau du chloroplaste et participé à sa séquestration. Mais il est plus probable que cette induction soit une réponse au stress oxydatif causé par le Pb.

Enfin, deux gènes codant pour des métallothionéines, MT2a (At3Gg09390) et MT2b (At5g02380) sont induits au niveau des racines d'*H. incana*. Si la fonction de protection contre le Cd des métallothionéines est bien connue chez les mammifères (Klaassen *et al.*, 1999), leur rôle dans la tolérance aux métaux chez les plantes est moins bien connu. Toutefois, des études ont montré l'implication de MT2a dans la tolérance au Cu chez *Arabidopsis* (Guo *et al.*, 2008) et au Cd chez *Vicia faba* (Lee *et al.*, 2004). MT2a est localisée dans le cytosol et participerait à la chélation des ETMs mais n'interviendrait pas dans la séquestration des ETMs au niveau vacuolaire (Lee *et al.*, 2004). Nous avons émis l'hypothèse, grâce à l'analyse phénotypique du mutant *mt2a*, que MT2a serait impliquée dans la tolérance au Pb chez *H. incana* en chélatant le Pb (Chapitre 3 ; Auguy *et al.*, soumis). Le gène *MT2a* étant induit par un facteur 5 au niveau des parties aériennes d'*H. incana*, laisse supposer que cette chélation ait plutôt lieu au niveau de cette organe. De plus, MT2a pourrait aussi intervenir dans le nettoyage des ROS (Zhu *et al.*, 2009 ; Hassinen *et al.*, 2011). Le gène *MT2b* est exprimé dans le phloème de tous les organes (Guo *et al.*, 2003) et augmenterait la tolérance au Cu en interagissant avec d'autres composants présents chez la plante tolérante *Silene vulgaris* (Van Hoof *et al.*, 2001 ; Grispen *et al.*, 2011). Par analogie, on peut penser que MT2b pourrait être impliqué dans la tolérance au Pb chez *H. incana* en intervenant dans la redistribution du Pb au niveau du phloème.

3-3) Les gènes caractérisés sont-ils impliqués dans les mécanismes de tolérance au Pb ?

Pour savoir si les quatre gènes candidats retenus (tab. 10) sont impliqués dans la tolérance au Pb, et comme la transformation génétique d'*H. incana* n'est pas encore au point, nous avons choisi, dans un premier temps, d'analyser le phénotype des mutants d'insertion d'*Arabidopsis* en présence de Pb. Ces dernières années, la génétique inverse a ainsi permis de caractériser de nombreux gènes impliqués dans la tolérance aux ETMs (Lee *et al.*, 2005 ; Ma *et al.*, 2006 ; Kim *et al.*, 2006 et 2007 et Cao *et al.*, 2008). Si les gènes sont impliqués dans les mécanismes moléculaires de la tolérance au Pb, leurs mutants KO devraient être, a priori, plus sensibles au Pb que la lignée sauvage Col-0. La sensibilité au Pb a été évaluée en mesurant la

longueur de la racine primaire des mutants par rapport à la lignée sauvage en présence de Pb (fig. 31).

De même, la teneur en Pb dans les différents organes a également été mesurée dans les lignées mutantes par rapport à la lignée sauvage, cultivées en présence de Pb (fig.32). Le phénotype des mutants devrait nous renseigner sur l'implication des gènes étudiés dans les mécanismes moléculaires de l'accumulation du Pb. Si le phénotype du mutant est différent de celui de la lignée sauvage, selon le niveau d'accumulation et l'organe, nous pourrions alors émettre des hypothèses sur le rôle de la protéine dans l'accumulation du Pb (translocation, absorption ...).

3-3-1) Longueur de la racine primaire

Cultivées en absence de Pb, les six lignées mutantes ne présentent pas de différence significative de la longueur de la racine primaire par rapport à la lignée témoin Col-0 (fig. 31). Ce résultat indique que les 4 gènes analysés ne semblent pas être directement impliqués dans le contrôle de la croissance des racines. En présence de Pb, Il n'y a pas de différence significative, par rapport à la lignée témoin Col-0, de la longueur de la racine primaire pour les mutants *cubd* et *fer1*. Les gènes *CUBD* et *FER1* ne seraient donc pas impliqués dans les mécanismes moléculaires qui régissent la tolérance au Pb.

Pour les mutants *mt2b_1* et *_2* et *pdf1.2b_1*, une augmentation significative de la longueur de la racine primaire est observée par rapport à la lignée témoin Col-0, en présence de Pb alors qu'il n'y a pas de différence en absence de Pb. Cette augmentation de la longueur est due au Pb et pas à la mutation puisque, lorsqu'ils sont cultivés sans Pb, les mutants ne sont pas affectés. Sachant que le nombre moyen d'insertion T-DNA par locus est de 1.5, une autre insertion pourrait avoir eu lieu dans un gène qui régulerait négativement la croissance mais, si c'était le cas, une augmentation de la longueur de la racine primaire serait également observée pour les mutants, en absence de Pb. De plus, nous avons, pour le gène *MT2b*, deux mutants avec des insertions à des endroits différents dans le gène, qui se comportent de la même manière. La construction d'une lignée mutante ARN interférant (RNAi) pour ces deux gènes permettrait de trancher sur ce phénotype. L'analyse phénotypique des quatre mutants correspondant aux gènes *MT2b* et *PDF1.2b* ne nous permet de conclure sur l'implication de ces gènes dans la tolérance au Pb chez *A. thaliana*.

3-3-2) Teneur en Pb

Pour la lignée mutante *cubd*, une augmentation significative de la teneur en Pb est observée au niveau des racines par rapport à la lignée sauvage Col-0 (fig. 32B), sans qu'aucune différence significative ne soit observée au niveau des parties aériennes (fig. 32A). Ce phénotype ne nous pas permet d'émettre une hypothèse sur le rôle de ce gène dans la tolérance au Pb. En effet, si le gène *CUBD* était impliqué dans des mécanismes d'accumulation du Pb, une diminution de la concentration en Pb au niveau des parties aériennes devrait être observée, ce qui n'est pas le cas.

Les teneurs en Pb de la lignée mutante *fer1* augmentent de façon significative que ce soit au niveau des parties aériennes (fig. 31A) ou des racines (fig. 32B). Cette augmentation laisserait supposer que la ferritine pourrait être impliquée dans des mécanismes d'exclusion du Pb, mais il n'y a aucune donnée existante dans la littérature sur ce point. La ferritine est plutôt connue pour être impliquée dans les mécanismes de chélation et de stockage (Palmer *et al.*, 2009).

Les lignées mutantes des gènes *MT2b* et *PDF1.2b* ont le même phénotype. Une diminution significative de la teneur en Pb au niveau des parties aériennes est observée (fig. 31A) avec, en parallèle, une augmentation de la teneur en Pb au niveau des racines (fig. 31B). Un tel phénotype semble indiquer que ces deux gènes coderaient pour des protéines qui interviendraient dans la distribution du Pb au niveau de la plante. Pour la défensine, *PDF1.2b*, Cela corroborerait l'hypothèse émise par Mirouze *et al.* (2006) sur la putative interaction des défensines avec un transporteur tel qu'HMA4 impliqué dans la translocation des ETMs. Quant à la métallothionéine *MT2b*, elle serait plutôt impliquée dans la distribution des ETMs via le phloème (Guo *et al.*, 2003). La mesure de l'accumulation du Pb au niveau des mutants par rapport à la lignée sauvage semble plus adaptée pour mettre en évidence l'implication de transporteurs dans l'accumulation du Pb que des chélateurs (Auguy *et al.*, soumis ; chapitre 3).

Sur les quatre gènes candidats étudiés, deux ne semblent pas être directement impliqués dans les mécanismes moléculaires de la tolérance au Pb chez *A. thaliana*. Il s'agit des gènes *CUBD* et *FER1*. Pour les deux autres gènes, *MT2b* et *PDF1.2b*, l'analyse phénotypique des lignées mutantes ne nous a pas permis de conclure sur leur implication dans les mécanismes moléculaires de la tolérance au Pb, mais il semblerait qu'ils soient impliqués ainsi que *FER1* dans les mécanismes d'accumulation du Pb chez *H. incana*. D'autres

méthodes d'analyse phénotypique pourront être testées pour confirmer ce résultat comme la mesure du poids frais, les teneurs en chlorophylle ou en anthocyane. La complémentation du phénotype des lignées mutantes par les gènes d'*H. incana* sera indispensable pour conclure sur l'implication de ces gènes dans l'accumulation du Pb chez *H. incana*. La sur-expression des gènes *CUBD* et *FER1* d'*H. incana* dans la lignée sauvage Col-0 ne devrait pas augmenter la tolérance au Pb d'*A. thaliana*. Par contre, si la sur-expression des gènes *MT2b* et *PDF1.2b* augmente la tolérance au Pb d'*A. thaliana* alors ces gènes pourraient être impliqués dans les mécanismes de la tolérance au Pb.

Chapitre 5

Conclusions

et

Perspectives

Au Maroc, l'épuisement des ressources minérales et le contexte économique mondial ont conduit à la fermeture de très nombreux sites miniers, en général abandonnés, sans contrôle et soumis aux aléas climatiques spécifiques du bassin méditerranéen (longues périodes de sécheresse entrecoupées de pluies intenses, de vents violents ainsi que des températures élevées). De plus, les caractères édaphiques de ces régions à savoir, des sols érodés et pauvres en éléments nutritifs, ralentissent encore la régénération spontanée du sol et la végétation sur des terrains contaminés. Dans cette situation, les érosions éoliennes et hydriques sont deux processus majeurs de la diffusion de la contamination vers les différents compartiments de l'environnement et vers les populations. La diffusion de la contamination vers la ressource en eau, la biosphère et la chaîne alimentaire conduit à une exposition des populations dont le niveau peut présenter un risque sanitaire au regard des seuils de toxicité déterminés par les institutions de veille sanitaire internationales.

Une étude préliminaire a permis de mettre en évidence la pollution polymétallique des sols du site d'étude situé dans l'est marocain au sud de la ville d'Oujda (Smouni *et al.*, 2010). L'analyse de la composition en métaux des sols du site d'étude a révélé des taux élevés en ETMs aboutissant à un index de pollution très élevé qui montre que la combinaison en métaux dans les sols est une source potentielle de toxicité pour la flore, la faune et les habitants. Malgré un environnement hostile du milieu, plusieurs essences végétales ont été observées sur les sites et sont parfaitement adaptées aux conditions édapho-climatiques de la région. Ces plantes présentent un potentiel important pour le développement de stratégies de réhabilitation des sites miniers par des approches de phytomanagement (revégétalisation, phytoextraction, phytostabilisation).

Afin d'identifier des plantes endémiques de cette région, susceptibles d'avoir acquis une tolérance aux ETMs et qui pourraient être utilisées dans un programme de phytomanagement, un inventaire des plantes prépondérantes sur le site d'étude, ainsi que l'analyse de leur teneur en ETMs, ont été réalisés. Cet inventaire a permis de mettre en évidence un certain nombre de plantes telles que *Cistus libanotis*, dont l'utilisation en phytoremédiation a été brevetée (Brevet international N°09 305 421), *Artemisia herba-alba*, *Dittrichia viscosa*, *Noea mucronata* et *Hirsfeldia incana*. Cette dernière accumule des quantités non négligeables de Pb au niveau de ces parties aériennes. Elle a été choisie pour identifier et caractériser des gènes impliqués dans la tolérance au Pb. En effet, *H. incana* présente une croissance rapide et un cycle végétatif court. C'est une métalphyte facultative et elle est facile à manipuler en laboratoire. Mais sa principale qualité est d'être une brassicacée génétiquement proche d'*A. thaliana*, permettant ainsi l'utilisation des outils mis

en place pour cette plante modèle (génomé séquencé et annoté, banque de mutants d'insertion).

Dans un premier temps, une caractérisation physiologique d'*H. incana* a permis de confirmer sa tolérance au Pb ainsi que son caractère accumulateur de Pb au niveau des racines mais aussi au niveau des parties aériennes.

Ensuite, parmi les sept gènes choisis dans une approche gène candidat, seuls trois d'entre eux ont montré une augmentation significative de leur expression, après une exposition au Pb, par rapport à la plante sensible au Pb *A. thaliana*, au niveau des racines. Ces trois gènes codent pour les transporteurs ATM3 et HMA4 et pour la glutathion synthétase 2 (GS2). Les gènes, codant pour le transporteur HMA4 et la métallothionéine MT2a, ont montré, suite à un traitement au Pb, une augmentation significative de leur expression, par rapport à la plante sensible *A. thaliana*, au niveau des parties aériennes. Le fait que la phytochélatine synthétase ne soit pas induite par le Pb chez *H. incana* et que la GS2 le soit, pourrait indiquer un rôle du glutathion, plutôt que de la phytochélatine, dans la chélation du Pb chez *H. incana*. De plus, l'induction du gène codant pour le transporteur ATM3, qui transporterait les conjugués glutathion-ETMs, est un élément qui irait aussi dans ce sens (Kim *et al.*, 2006 ; Bhuiyan *et al.*, 2011). Toutefois, il semblerait que le transporteur mitochondrial ATM3 serait plutôt impliqué dans le transport de sulfures qui sont indispensables à l'assemblage des clusters Fe-S dans le cytosol qui entrent dans la composition d'enzymes ayant des fonctions redox et catalytiques (Bernard *et al.*, 2009). Enfin, l'analyse phénotypique des mutants *mt2a* et *hma4* a permis de montrer que le gène *MT2a* serait impliqué dans la tolérance au Pb et que le gène *HMA4* dans la tolérance et l'accumulation du Pb. La corrélation entre les données d'expression et l'analyse phénotypique des mutants, laisse supposer qu'*HMA4* serait impliqué dans la translocation du Pb et que *MT2a* interviendrait dans la détoxification en chélatant le Pb au niveau des parties aériennes (fig. 33).

L'approche qui a consisté à comparer le transcriptome d'*H. incana* plante tolérante au Pb et celui d'*A. thaliana* plante sensible au Pb a abouti à l'établissement d'une liste de gènes candidats susceptibles d'être impliqués dans la tolérance au Pb. Cette liste de gènes candidats a été affinée grâce au logiciel MapMan, pour ne conserver que quatre gènes, *CUBD*, *FER1*, *MT2b* et *PDF1.2b*. L'approche de génétique inverse a permis de mettre en évidence l'implication possible de *MT2b*, *PDF1.2b* et *FER1* dans l'accumulation du Pb et n'a pas pu préciser leur rôle dans la tolérance au Pb.

Nous avons pris le parti de nous intéresser seulement aux gènes sur-exprimés chez *H. incana* par rapport à *A. thaliana*. Il a été montré que les gènes impliqués dans la tolérance aux

ETMs étaient souvent présents en plusieurs exemplaires chez la plante tolérante (Shahzad *et al.*, 2010). Ce pourrait être le cas, chez *H. incana*, d'*HMA4* (Talke *et al.*, 2006 ; Hanikenne *et al.*, 2008 ; O' Lochlainn *et al.*, 2011) et de *ZIP9* (Talke *et al.*, 2006). Il serait intéressant de déterminer le nombre de copies de ces gènes chez *H. incana* pour voir si les mécanismes d'adaptation au Pb chez cette plante sont les mêmes que ceux mis en place par des plantes hyperaccumulatrices comme *A. halleri* ou *N. caerulescens*.

L'approche globale choisie a permis d'identifier un certain nombre de gènes susceptibles d'être impliqués dans la tolérance au Pb chez *H. incana*. Cette étude ne nous permet pas de proposer un modèle complet des mécanismes de la tolérance au Pb chez *H. incana* mais elle nous fournit un certain nombre de pistes qu'il conviendra d'explorer. Nous pouvons, cependant, tenter de replacer les gènes identifiés dans un schéma hypothétique des mécanismes moléculaires de la tolérance au Pb chez *H. incana* (fig. 33).

Le Pb entrerait dans la cellule grâce aux transporteurs membranaires ZIP 9 et ZIP11. Le gène *ZIP11* étant induit au niveau de la racine, le transporteur pour lequel il code pourrait jouer un rôle dans l'absorption du Pb au niveau racinaire. Le gène *ZIP9* étant induit au niveau des parties aériennes, laisse supposer que ce transporteur pourrait être impliqué dans le déchargement du xylème.

Le Pb serait ensuite chélaté au niveau du cytosol par plusieurs molécules, dont le glutathion (GSH), grâce à l'action des glutathion-S transférases et pas, à priori, par des phytochélatines. Les conjugués Pb-glutathion pourraient ensuite être stockés dans la vacuole via le transporteur MRP14. Parmi les molécules qui pourraient se lier au Pb, on compte les défensines qui pourraient soit chélater le Pb, soit interagir avec des transporteurs membranaires tel qu'*HMA4*. D'autres molécules pourraient intervenir dans la chélation du Pb, il s'agit des protéines de la famille des LEA et de la ferritine 1 (FER1) au niveau des plastes. Les métallothionéines MT2a et MT2b chélateraient le Pb au niveau du cytosol, MT2a serait plutôt impliqué dans la chélation du Pb au niveau des parties aériennes et MT2b pourrait intervenir dans la redistribution du Pb via le phloème. Une partie du Pb serait stockée par séquestration au niveau de la vacuole, via les transporteurs MRP14 sous forme de conjugué Pb-glutathion et via le transporteur TDT sous forme Pb-Acide malique. Il y aurait translocation du Pb via le xylème de la racine vers la feuille grâce aux transporteurs *HMA4* et *DTX13*.

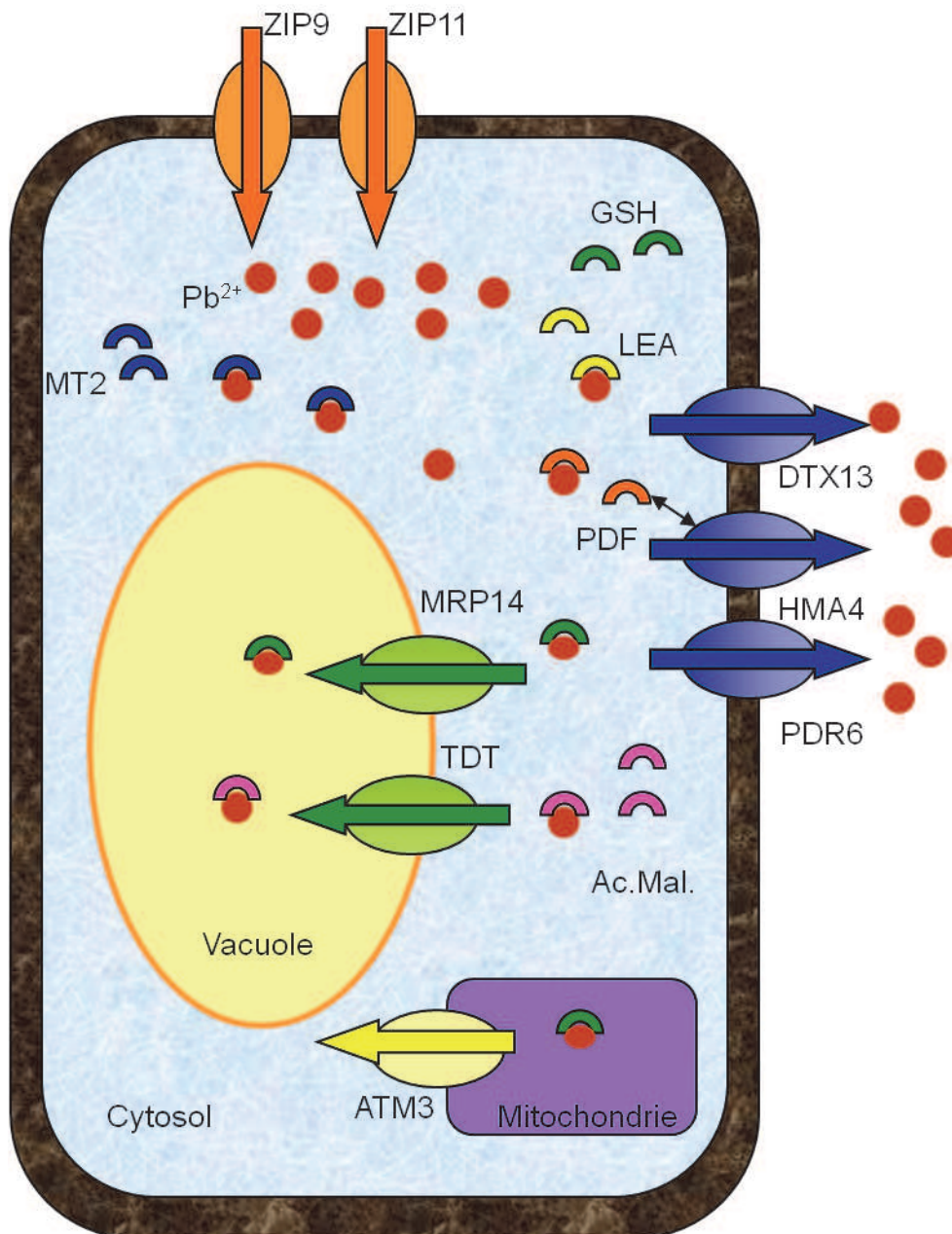


Figure 33 : Schéma hypothétique des mécanismes moléculaires de la tolérance au Pb chez *H. incana*. Transporteurs d'influx : en orange, ZIP9, At4g33020 ; ZIP11, At1g55010. Transporteurs localisés au niveau du tonoplaste et impliqués dans la séquestration : en vert, MRP14, At3g59140 ; TDT, At5g47560. Transporteur d'efflux localisé au niveau de la mitochondrie : en jaune, ATM3, At5g58270. Transporteurs d'efflux, en bleu : HMA4, At2g19110 ; DTX13, At1g15180, PDR6, At2g36380. Le Pb^{2+} est représenté par un cercle rouge, les chélateurs sont représentés par un arc de cercle vert pour le glutathion (GSH), bleu pour les métallothionéines MT2a (At3Gg09390) et MT2b (At5g02380), orange pour les défensines PDF1.2b (At2g26020) et PDF1.3 (At2g26010), jaune pour les LEA (At3g24080, At5g66400 et At4g38410) et rose pour l'acide malique. La paroi cellulaire est représentée en marron, la vacuole en jaune, la mitochondrie en violet et le cytosol en bleu clair (Inspiré de Lin & Aarts, 2012).

L'analyse phénotypique des mutants d'insertion n'a porté que sur quatre gènes issus de la comparaison transcriptomique entre *H. incana* et *A. thaliana*. Lever le verrou de la transformation génétique d'*H. incana* est une étape indispensable pour confirmer, par des approches de génétique inverse (RNAi) ou par sur-expression des gènes, le rôle de ces gènes dans la tolérance chez *H. incana*. Des études de la régulation des gènes (promoteur-gène rapporteur) pourront être réalisées pour préciser la localisation et le niveau de l'expression des gènes. Il serait également intéressant de caractériser l'expression d'autres gènes, en particulier ceux codant, pour des transporteurs comme TDT au niveau du tonoplaste ou ZIP9, ZIP11 et HMA4 au niveau membranaire, ceux qui pourraient apporter un éclairage sur le transport et le stockage du Pb.

D'autres méthodologies pourraient être mises en oeuvre pour identifier d'autres gènes impliqués dans la tolérance au Pb chez *H. incana*, comme l'expression de banques d'ADNc dans la plante modèle *A. thaliana* (Ni *et al.*, 2007). Une approche de ce type avait été amorcée mais avec une banque soustractive pleine longueur d'ADNc d'*H. incana*. Cette banque soustractive a été réalisée en soustrayant les ADNc de plantes d'*H. incana*, cultivées en condition normale, aux ADNc de plantes cultivées en présence de 100 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. Le protocole classique a été adapté par mes soins pour obtenir des ADNc pleines longueurs qui sont indispensables à l'expression directe, après transformation, de ces gènes dans *A. thaliana*. Mais le faible pourcentage d'ADNc pleine longueur (64%) et, surtout, la surface réduite de la salle de culture du laboratoire d'accueil nécessaire au screening des mutants n'a pas permis l'aboutissement de ce projet. Toutefois, cette banque soustractive pourrait-être exploitée, par exemple, en la séquençant ou en transformant la levure pour donner ainsi de nouvelles pistes sur les gènes impliqués dans la tolérance au Pb chez *H. incana*.

Chapitre 6

Matériel et Méthodes

1) Matériel

1-1) Matériel végétal

Les graines d'*Hirschfeldia incana* ont été récoltées sur le site de Oued el Himer, aux abords d'une fonderie de plomb (coordonnées GPS : Alt: 959m, N 34° 24 88' W 001°54 03'). Les graines d'*Arabidopsis thaliana*, écotype Columbia-0 (Col-0) et écotype Wassilewskija (Ws) ainsi que les mutants d'insertion, ont été fournies par le « Nottingham Arabidopsis Stock Center » (NASC).

1-2) Echantillons de sol

Les échantillons de sol ont été prélevés sur 22 stations dans les trois sites étudiés : fonderie de Oued el Himer, digues de Boubker et de Touissit. Les échantillons, prélevés dans la couche superficielle du sol, avaient une surface 0,3 m² et une profondeur de 10 cm. Les échantillons ont été homogénéisés et tamisés (< 2 mm).

1-3) Bactéries

Les souches d'*Escherichia coli* utilisées pour la transformation génétique sont des Top 10 (Invitrogen) dont le génotype est F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*ara**leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str^R) *endA1* *nupG*, ou des DH10B dont le génotype est F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *endA1* *araD139* Δ (*ara* *leu*) 7697 *galU* *galK* *rpsL* *nupG* λ -.

La souche bactérienne DB3.1 (Invitrogen) de génotype F- *gyrA*462 *endA1* *glnV*44 Δ (*sr1-recA*) *mcrB* *mrr* *hsdS*20(*r_B*⁻, *m_B*⁻) *ara14* *galK2* *lacY1* *proA2* *rpsL*20(*Sm*^r) *xyl5* Δ *leu* *mtl1* a été utilisé pour multiplier les plasmides contenant le gène *ccdB*.

La souche d'*Agrobacterium tumefaciens* utilisée pour la transformation génétique d'*A. thaliana* est la souche C58C1 pGV3101 pMP90 ; elle est résistante à la rifampicine et à la gentamicine.

1-4) Plasmides

Le plasmide utilisé en routine pour cloner les produits de PCR est pGEM-T easy (Promega) ; il confère la résistance à l'ampicilline.

Les plasmides utilisés pour le clonage Gateway sont le plasmide pDNR 207 (Invitrogen) qui porte la résistance à la gentamicine, le plasmide pCB2004 (Lei ZY et al., 2007) et sa version allégée le plasmide pCB406 (Ni et al., 2007). Ces 2 derniers vecteurs

binaires portent la résistance bactérienne à la kanamycine et confèrent aux plantes transformées la résistance au glufosinate.

1-5) Amorces

Les amorces (tableaux 13 à 19) ont été dessinées à l'aide du logiciel Primer 3 (Rozen & Skaletsky, 2000). La présence de dimères a été contrôlée avec le logiciel Amplify.

2) Méthodes

2-1) Milieux de culture

2-1-1) Plantes

Les graines d'*H. incana* ou d'*A. thaliana* sont traitées pendant 15 min avec du Domestos 20% (v/v) puis rincées 4 fois avec de l'H₂O distillée stérile. Ces graines sont ensuite mises à germer sur du milieu MS/2 (Murashige & Skoog, 1962), supplémenté avec 1% (m/v) de saccharose et d'agar (agar-agar, Sigma) en boîtes de Pétri carrées (12 x 12 cm). Les boîtes sont placées 48h à 4°C pour synchroniser la germination des graines. Les boîtes sont ensuite placées à la verticale en chambre de culture à 22°C, avec une photopériode de 16 h de jour. Après 2 semaines, les plantules sont transférées en hydroponie avec une solution nutritive BD (Broughton & Dilworth, 1971). Le traitement au Pb est réalisé 2 semaines plus tard en supplémentant une nouvelle solution de BD sans apport de phosphate (pour éviter la précipitation du Pb dans la solution de culture) en présence de Pb(NO₃)₂ à la concentration souhaitée.

Pour la culture en milieu gélosé, les graines sont stérilisées puis transférées directement sur du milieu BD sans PO₄⁻, supplémenté avec 1% (m/v) de saccharose, 0.9% (m/v) d'agar et la concentration voulue de Pb(NO₃)₂ (100 µM pour *H. incana* et 40 µM pour *A. thaliana*). De la même façon, les boîtes sont placées à 4°C pendant 48h, puis transférées en chambre de culture.

2-1-2) Bactéries

Les bactéries sont cultivées sur du milieu LB (Bertani, 1951) en milieu liquide ou sur milieu gélosé (1.4% agar ; m/v) contenant les antibiotiques adéquats, pendant 12h à 37°C pour les *E. coli*, et pendant 48h à 28°C pour les agrobactéries.

2-2 Transformation génétiques

2-2-1) *A. thaliana*

La transformation génétique d'*A. thaliana* est réalisée en utilisant la technique dite de « floral dip » (Clough & Bent, 1998). Une pré-culture de la souche d'Agrobactérium contenant l'ADN à transférer est cultivée pendant 16h à 28°C sur du milieu LB contenant 50 mg/L de rifampicine, 50 mg/L de kanamycine et 15 g/L de gentamicine. Un mL de cette pré-culture est utilisé pour ensemer un erlenmeyer de 1L contenant 250 mL de LB avec 50 mg/L de kanamycine. Après 16h de culture, l'absorbance de la culture est mesurée à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. La culture bactérienne est culottée par centrifugation à 4000 g pendant 15 min. Le culot est repris par le volume nécessaire d'une solution contenant 5% (m/v) de sucrose et 0,02% (v/v) de silwett L77 pour obtenir une absorbance finale de 0,8. Les plantules âgées d'environ 1 mois (stade 2-3 siliques) sont trempées dans la solution d'agrobactéries pendant 2 min. Elles sont ensuite placées dans la chambre de culture, dans un sac autoclave fermé. Le sac est ouvert 24 h plus tard et les plantules sont arrosées par sub-irrigation avec une solution d'engrais diluée (1,5 mL d'algoflash pour 5 L d'H₂O). Lorsque les graines sont arrivées à maturité, elles sont récoltées, séchées et semées à la volée sur du terreau. Les transformants sont sélectionnés en pulvérisant, tous les 2 jours, les plantules dès leur levée (5 jours) avec une solution de Basta à 0,2% (v/v). Les plantules résistantes au Basta sont transférées en pot individuel et cultivées en chambre de culture jusqu'à la production des graines.

2-2-2) *E. coli*

Les bactéries Top 10 (Invitrogen) sont compétentes à la transformation par choc thermique. Par contre, les bactéries DB3.1 et DH10B ont dû être traitées pour être compétentes. Une pré-culture de ces souches est réalisée dans 5 mL de LB pendant 16 h. Un mL de cette pré-culture permet d'ensemencer 250 ml de milieu LB. La culture est incubée à 37°C sous agitation jusqu'à une absorbance à 600 nm de 0,2 – 0,3. La solution bactérienne est placée dans la glace pendant 30 min, puis centrifugée pendant 15 min à 3000 g à 4°C. Le culot est repris successivement dans un ½ volume de 0,1 M MgCl₂ froid, dans ¼ puis 1/10 de volume de 0,1M CaCl₂, 15% glycérol (v/v) froid, par rapport au volume initial de culture. A chaque étape, la culture bactérienne est centrifugée 15 min à 3000 g à 4°C. La solution bactérienne finale est aliquoté en tube de 200 µL, congelée rapidement dans l'azote liquide puis conservée à -80°C.

Les bactéries compétentes ainsi préparées sont transformées par choc thermique. Dix μL de plasmide sont mélangés aux 200 μL de bactérie. Le mélange est ensuite incubé 30 min dans la glace. Le choc thermique est réalisé par incubation 30 s à 42°C puis 2 min dans la glace. Trois cents μL de milieu LB sont rajoutés et la solution bactérienne est incubée 1 h à 37°C sous agitation douce. Les bactéries transformées sont sélectionnées sur un milieu sélectif contenant l'antibiotique approprié.

2-2-3) *A. tumefaciens*

Les agrobactéries sont traitées pour être électro-compétentes à la transformation. Une pré-culture de la souche bactérienne est réalisée dans 5 mL de milieu LB contenant les antibiotiques nécessaires au maintien des plasmides, pendant 48 h à 28°C. Ensuite, 250 mL de milieu LB, avec les mêmes antibiotiques, sont ensemencés avec 1 mL de pré-culture et incubés à 28°C sous agitation, jusqu'à atteindre une absorbance de 0,5- 0,7. La culture est refroidie dans la glace puis centrifugée 10 min à 3000 g à 4°C. Le culot bactérien est lavé 3 fois dans le même volume d' H_2O puis il est repris dans 1/2 puis 1/100 de volume de glycérol 10% (v/v). Enfin, les bactéries sont aliquotées par 40 μL , puis rapidement congelées dans l'azote liquide et conservées à -80°C.

Pour la transformation, 40 μL de bactéries compétentes et 100 ng de plasmides sont transférés dans une cuve à électroporation. Les bactéries sont soumises à un choc électrique de 1,4 kV pendant 5 ms (Multiporator Eppendorf, mode procaryote). Quatre cents μL de milieu LB sont ajoutés et les bactéries sont placées pendant 2 h sous agitation douce à 28°C. La sélection des transformants se fait sur du milieu LB contenant 25 mg/L de rifampicine, 12,5 mg/L de gentamycine et 50 mg/L de kanamycine.

2-3) **Biologie moléculaire**

2-3-1) Extraction des acides nucléiques

- ADN génomique

Une centaine de mg de matériel frais sont prélevés et broyés à l'aide d'un « piston pellet » directement dans 500 μL de tampon d'extraction (100mM Tris-HCl pH8, 50mM EDTA pH 8, 500mM NaCl). Soixante dix μL de SDS 10% (p/v) sont ajoutés. Les échantillons sont homogénéisés puis incubés 10 min à 65°C. Cent trente μL d'acétate de Potassium 5M sont ensuite rajoutés et les échantillons sont incubés 10 min dans la glace avant d'être centrifugés 15 min à 13 000 rpm. Cinq cents μL de surnageant sont prélevés et rajoutés à 500 μL d'isopropanol et incubés 15 min à -20°C. L'ADN précipité est récupéré par

centrifugation 5 min à 13000 rpm. Le culot est séché une trentaine de min sur la paillasse puis repris dans 30 µL d'H₂O ultra pure.

- ARN

Les ARN totaux des feuilles et des racines d'*A. thaliana* et des racines d'*H. incana* ont été extraits en utilisant le kit RNeasy (Qiagen) en suivant les recommandations du fabricant. Les ARN totaux des feuilles d'*H. incana* ont été obtenus en utilisant le kit RNAqueous avec le « Plant RNA isolation aid » (Ambion) en suivant les directives du fabricant. Les extractions ont été réalisées sur des triplicats biologiques. La qualité des ARN a été vérifiée par électrophorèse sur un gel à 1% (p/v) d'agarose, en conditions non dénaturantes. Pour les puces à ADN, la qualité des ARN a été vérifiée sur un Bioanalyseur (Agilent).

- ADN plasmidique (minipréparation)

Trois mL d'une culture bactérienne incubée 16 h à 37°C en présence de l'antibiotique adéquat sont utilisés pour l'extraction du plasmide bactérien par le kit Wizard Plus SV Miniprep (Proméga) en suivant le protocole défini par le fabricant.

2-3-2) Traitement à la DNase

Quelque soit le kit utilisé pour l'extraction d'ARN, les échantillons sont traités avec la Turbo DNase (Ambion) selon les recommandations du fabricant.

2-3-3) Transcription inverse

Un µg d'ARN total est rétro-transcrit en utilisant la Superscript III (Invitrogen) ou l'AMV (Promega) avec comme amorce un oligo (dT)₂₀ selon les protocoles préconisés par les fabricants. Les transcriptions inverses sont réalisées en duplicat puis rassemblées en fin de réaction pour minimiser la variabilité de la réaction.

2-3-4) QPCR

La quantité d'ADNc utilisée pour chaque réaction correspond à 1,5 ng d'ARN total, en effet 1 µg d'ARN a été utilisé pour la transcription inverse dans un volume final de 20 µL. 3µL dilué au 1/100 de cette solution sont utilisés pour la réaction de PCR. Une réaction de PCR contient 3 µL d'ADNc, 7,5 µL de SYBRGreen (Brillant II, Agilent) ou de Mesagreen (Eurogentec) et 2,25 µL de chaque amorce à 2 µM. Le volume final de la réaction est de 15 µL. Les réactions de PCR ont été réalisées en utilisant l'appareil à QPCR, MX3005P (Agilent) et le programme suivant : 5 min à 95°C, 40 cycles de 10 s à 95°C et 30s à 60°C pour le Brilliant II et 5 min à 95°C, 40 cycles de 15 s à 95°C et 1 min à 60°C pour le Mesagreen.

Ces cycles d'amplification sont suivis systématiquement d'un cycle appelé courbe de dissociation : 1 min à 95°C, 30s à 50°C suivi d'une augmentation constante de la température jusqu'à 95°C avec lecture de la fluorescence en continu, ceci va nous permettre de vérifier qu'il y a bien qu'un seul produit de PCR amplifié. La liste des amorces utilisées est fournie dans le tableau 13 pour *H. incana* et dans le tableau 14 pour *A. thaliana*.

Tableau 13 : Amorces utilisées pour la Q-PCR sur les ADNc d'*H.incana*.

Nom	Amorce sens 5'-3'	Amorce Anti-sens 5'-3'
Tub	ATCCACTTCATGCTTTCCTC	GGTAGTTGATACCGCACTTGAA
ATM3	GTGTGACGAGGCAACAAGTG	CACCTTCCCGTTTCTCCAGTA
CNGC1	ACAAACGGTGGAAGAACAGG	AACGTATGCCTCAGCTGCTT
GS2	CAAGCAGTCGCAGTGGTTTA	GCGAGTTCTTGCTGGATTTT
HMA4	CCTCATCTACTTCAACTTCTTCTC	GCAGCAGTCGTGTTCTTATTC
MRP3	TTCAAGGGTGGGAGATGAAG	CAAGTGGGATGCCAAGAAGT
MT2a	ACTGGTAATGATTCGTTGATG	AGCCTCGTACTGCTGGTTCTTC
PCS1	GTATCACAGAGGGGTGTTTA	GAGGGGGATACTTGAAACG

Tableau 14 : Amorces utilisées pour la Q-PCR sur les ADNc d'*A. thaliana*.

Nom	Amorce sens 5'-3'	Amorce Anti-sens 5'-3'
Tub	ATCCACTTCATGCTTTCCTC	GGTAGTTGATTCCACACTTGAA
ATM3	CAGCACAACAGAGGCAGAGA	CACCTTCCCGTTTTCCAGTA
CNGC1	TCACAACAAACGGTGGAAGA	TTGGGAGGTTTGAGGATGAG
GS2	CAAGCAGTCGCAGTGGTTTA	GCCAGTTCTTGCTGGATTTT
HMA4	CACACAGAGCCGTCAAGGTA	TGCATAACTCCTGCAACAGC
MRP3	GTGTTCCAGTGAACCACT	CTCGCAACACAAGAGGCATA
MT2a	TCTCCGGCGAGACAACCACAA	TTCTCAGCGTTGTTACTCTCCCCT
PCS1	CGTCAAATGCACGAGTTCTG	GAGGGGGATACTTGAAACG

L'efficacité de chaque couple d'amorces a été testée en réalisant la QPCR sur une dilution sérielle de 5 en 5 des ADNc (de 1/5 à 1/15625). Le gène de la tubuline a été choisi comme gène normalisateur parce qu'il a moins d'un cycle seuil (Ct) d'écart entre les différentes conditions et échantillons. Les échantillons, feuilles et racines, traités par le Pb ont été normalisés par les échantillons, feuilles et racines, cultivés en condition normale c'est à dire non traités par le Pb. L'expression relative de chaque gène a été calculée en utilisant la formule dite du ΔC_t en prenant compte l'efficacité de chaque gène :

$$\text{Ratio} = \frac{(1+E_{GI})^{\Delta C_t_{GI}}}{(1+E_{\text{norm}})^{\Delta C_t_{\text{Norm}}}}$$

où

E_{GI} : Efficacité du gène d'intérêt

E_{Norm} : Efficacité du gène normalisateur (tubuline)

ΔCt : $Ct_{-pb} - Ct_{+pb}$

Pour la validation des puces à ADN, 31 couples d'amorces ont été utilisés pour *H. incana* et 7 pour *A. thaliana* (tab.15). Les amorces ont été dessinées à l'aide du logiciel Primer 3 dans la zone de la sonde utilisée pour l'hybridation pour les puces à ADN. Seules les amorces ayant un profil d'amplification correct (efficacité entre 90 et 110%) ont été retenues. Pour cette validation, l'expression relative de chaque gène a été calculée en utilisant la formule $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Tableau 15 : Amorces utilisées pour la validation par Q-PCR de la puce à ADN. 31 couples d'amorces ont été utilisés pour *H. incana* et 7 couples d'amorces (en gras) pour *A. thaliana*.

Nom	Amorce sens (5'-3')	Amorce anti-sens (5'-3')
At1g06650	TCCTCATGTTCCGGCGCTCT	ACATGCGACAGACACTCGAGCT
At1g15180	TACGCAGCAATGTCTCTTGC	GGTTTCCTTGTCAGTCTGA
At1g22990	CAAAGGAGCAAAATCAGTGGA	AGCCACCATTGTGTATGGAA
At1g74670	GGCAACAAACAAGTGTGTCC	TCCACCTTGTTGAGTCTCCA
At1g77510	AAAGATCAAAGTCTTGCTTCC	TGATGATGAGGGGAAGTGG
At2g26020	CATCACCTTTATCTACGCTGCTC	TTGGTACTTCAAAAGCTGCAAA
At2g28660	TCCACTGATGACCAGGTTGT	TATGACGTCACCCCTCCAT
At2g36380	TCAAAAATGGATTGCGGTTTC	GGACAACGGCTACAAGTGGT
At2g45180	CGCCTCTTAAAGCCAATGTC	GGTTAGATCAATAGGAACCTTGAG
At3g09390	TCTCCGGCGAGACAACCACAA	TTCTCAGCGTTGTTACTCTCCCT
At3g12750	TGCATCTGCTGGGATACTCA	CAGCCAAGTGAAGCCAGAG
At3g50560	AGACCGGAGAGCTTGACAC	TTGGGTTTGATGGTCCGATA
At3g59140	GAAGGATGAGAACTCTTTGTTTCG	TGAGACCAATACTCTTTCACAAGC
At4g08570	ACAAGAAGGCACCACCAAAC	CGCAAGAATTAGGGTTCTCG
At4g11600	AGATTCTTGCCTTCCGTGT	CGGGTACTCAGCCTTGAAAC
At4g13420	CAAAGCACTTGCGATTCTTA	AGGTCATGCCAACCTTGAGA
At4g17030	GGAAGAGATATCAATAACGGTGAAG	TCCATAGTCGCCATGAAACA
At4g25100	CCCTTGCTGCTCGGCTCTTTCCC	GCTTCCCAAGACACAAGATTGGTCA
At4g33020	TACATGGCGCTTGTGGATT	TCAACACTCATCTTCTTGCTCA
At4g35090	ACCGTACCTTTACACCAGAGAGGCA	ATCCAGATACTGCGGATTCATGCG
At5g01600	CAACGTTGCTATGAAGGGACT	TTCTCCTCTTTGGTTCTGG
At5g02380	GCAAGTGCAACCCTTGTACC	CCGGAAAAATCAGCCAATTA
At5g06530	TAACCCATTTTCCACACGAA	TCATTGTCAAGGATTGGTCGT
At5g09930	TCAAAGATGTCAAAGGCTGAGA	CTTGGCATTTTTGCTGGACT
At5g11930	ACATCAGAGTCAAAGATCGGACGGC	GAAGCTTCTTCATGACGTGGCACA
At5g13580	GGGGCTTCTCTTTTCAATC	TTTCAAACCAGTCTCCATAAGA
At5g15410	CGGTTACTTCAGTATGCAGCTATG	AGATGATCATGCGGTGCGAA
At5g18600	AGATCGAGCAGGCGTTGTT	CGCTTAAGCATGGGAATCAA
At5g38960	CCCGAATGTTCTTGCAAAGG	GAATGATCACCTTAGGATCCAAC
At5g45690	TGGCTGATTATTGGGTTTCATC	TTTCGATTATGTCAACCGCTAA
At5g59330	TTGGCTCTCAGGTTCTTCAT	GAAACTATGCACACCGTCAAAA

La quantification de l'expression des gènes a été mesurée en duplicat technique pour chaque triplicat biologique.

2-3-5) Puces à ADN

- Préparation des échantillons biologiques

L'expérimentation a été réalisée avec *H. incana* et *A. thaliana* (col0). Les graines d'*H. incana* et *A. thaliana* sont mises à germer et transférées ensuite en hydroponie selon le protocole décrit dans le chapitre 2-1-1. Les plantules âgées de 4 semaines, ont été traitées pendant 3 jours au Pb : 40 et 100 μM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ pour *A. thaliana* et *H. incana* respectivement. Un contrôle sans Pb a été réalisé dans les mêmes conditions. Huit à neuf plantules ont été utilisées par répétition et 3 répétitions biologiques ont été réalisées.

- Hybridation

Cinq cents ng d'ARN totaux ont été donnés à la plateforme génomique de la société IMAXIO (Biôpole Clermont-Limagne, France) pour réaliser l'hybridation sur la puce 44K *A. thaliana* (Agilent). Deux cents ng d'ARN totaux ont servi à la synthèse de l'ARNc marqué à la cyanine 3 (Cy3) pour les contrôles et à la cyanine 5 (Cy5) pour les échantillons traités au Pb. Les ARNc synthétisés sont contrôlés par dosage sur un Nanodrop ND 1000 (Thermo Scientific) et la qualité de leur profil électrophorétique est établie avec un Bioanalyseur 2100 (Agilent). Après l'amplification, les ARNc sont fragmentés pour obtenir des brins de 50 à 200 nucléotides par incubation pendant 30 min à 60°C dans un tampon spécifique. Ensuite 825 ng de contrôle_Cy3 (-Pb) et 825 ng de test_Cy5 (+Pb) sont hybridés 17h à 60°C.

- Analyse

Les lames ont été lues avec le scanner G2505C (Agilent). Le logiciel d'acquisition d'images Feature Extraction 10.7.3 (Agilent) a servi à quantifier la fluorescence. Les étapes de normalisation appliquées sont celles de lames avec une approche simple couleur. Une normalisation par quantile est réalisée afin d'obtenir les mêmes valeurs statistiques entre les lames. Cela a pour conséquence de diminuer la variance entre les lames. Ensuite une normalisation par sonde est réalisée par la médiane calculée sur tous les échantillons. Enfin les données sont transformées en Log pour tendre vers une distribution gaussienne. Les sondes sont ensuite filtrées pour ne retenir que celles pour lesquelles tous les réplicats d'au moins une des conditions testées ont une intensité supérieure au bruit de fond. Enfin, un test *t* de Student est appliqué avec les paramètres suivants : *p* asymptotique et inférieure à 0,05 et correction de Benjamini-Hochberg.

2-3-6) Isolement des ADNc d'*H. incana*

Les ADNc d'*H. incana* ont été isolés pour la plupart sur la base de leur homologie avec ceux d'*A. thaliana*, Les amorces ont été dessinées à partir des séquences des ADNc d'*A. thaliana*, ou à partir d'un alignement de séquences ou enfin tirées de la bibliographie (tab. 16). La température d'hybridation de la PCR était de 50°C pour permettre l'hybridation hétérologue des amorces.

Tableau 16: Amorces utilisées pour le clonage des ADNc d'*H. incana*.

Nom	Amorce 5'-3'	Références
AtTub_F	GAGTGCATTTTCGATCCACAT	
AtTub_R	GGTAGTTGATACCACACTTGAA	
AtMt2a_F	GCATGTGGTTGTGGATCTGG	
AtMt2a_R	CACTTGCATTGCATCGTTCTC	
HMA4_F	AGGTTAGAAGCAAACGTGA	Alignement
HMA4_R	GGTGTAGAGAGGATAAGACC	Alignement
MRP_F	CAAGGACGCACAAGTGGGAG	Alignement
MRP_R	TGTAGA ATCCTGAAGGTTGC	Alignement
PvPCS_F	TGGAGGTGGTTCGATGAATCAATG	Dong <i>et al.</i> , 2005
PvPCS_R	GGGATACTTGAAACGAGCAACATC	Dong <i>et al.</i> , 2005
AtATM3_F	GCTCGGCGTGCTGCAATTCATG	Kim <i>et al.</i> , 2006 modifié
AtATM3_R	GCTGCATCAAGCATATCCAC	Kim <i>et al.</i> , 2006 modifié
AtGS2_F	CAAGCAGTCGCAGTGGTTTA	
AtGS2_R	TTCGTCTTTGCTCCTGAGGT	
AtCNGC_F	GAAGAGACGCAGAACAATGG	Sunkar <i>et al.</i> , 2000
AtCNGC_R	CTGGCTCTGCTGGTTTCTGA	Sunkar <i>et al.</i> , 2000
AtMT2B_R	CCGGAAAAATCAGCCAATTA	
AtMT2B_F	ACATGTCTTGCTGTGGTGGA	
AtCuBd_R	CAAAACCACCTGCTACAAACA	
AtCuBd_F	TCCCTTAAAATCAACAGACAGAAA	
AtPDF_F	CGCTGCTCTTGTTCTCTTTGC	
AtPDF_R	GTGAGCTGGGAAGACATAGT	
AtFER_F	ATGGCCTCAAACGCACTCTC	
AtFER_R	CTAGTTCAGAAGCATCTGGTC	

2-3-7) Clonage des produits de PCR

Les produits de PCR sont purifiés à partir d'un gel d'électrophorèse (kit GeneClean, MP Biomedicals). Ils sont ensuite clonés dans le vecteur pGEM-T easy (Promega) en suivant les recommandations fournies par le fabricant. Le vecteur contenant l'ADNc a été utilisé pour transformer les bactéries DH10B compétentes par choc thermique. Les bactéries transformées ont été mises en culture sur du milieu LB gélosé contenant 100 mg L⁻¹ d'ampicilline, 0,5 mM d'IPTG et 8 mg L⁻¹ de X-GAL. Une dizaine de colonies blanches sont testées par PCR avec les amorces universelles M13. Une colonie positive est repiquée sur le milieu sélectif, puis une minipréparation de l'ADN plasmidique est réalisée à partir d'une

culture liquide ensemencée à partir de cette colonie. L'ADN plasmidique est séquencé sur les 2 brins avec les amorces universelles M13.

2-3-8) Race PCR

Les ADNc pleine longueur sont obtenus par amplification rapide des extrémités 5' et/ou 3' (Rapid Amplification of cDNA Ends : RACE-PCR) des fragments de gènes clonés en utilisant le kit « First Choice RLM-RACE » (Ambion) en suivant les spécifications du fabricant. La liste des amorces utilisées se trouve dans le tableau 17.

Tableau 17 : Amorces utilisées pour la RACE-PCR. Amorce RACE5' : amorce utilisée pour amplifier la partie 5', et amorce RACE3' : amorce utilisée pour amplifier la partie 3'.

Nom	Amorce 5'-3'
HMA4_RACE5'_inner	GTTTTCCCGTCCACTTTCAC
HMA4_RACE5'_outer	CCAACGGAGAGGCAGGTATA
HMA4_RACE3'_inner	TCATCTGGCTTTGCGATTGT
HMA4_RACE3'_outer	ATGGCTAAGCTGGTGGGAAGA
HMA4_RACE3'_inner2	CCAGAACTTTCCAGGTGAAGGA
HMA4_RACE3'_outer2	CAGTTCCAGAGATTGAGGTGGATAC
MT2A_RACE5'_inner	CAGCCAGATCCACAACCAC
MT2A_RACE5'_outer	GCCTCGTACTGGTTCTTCATC
MT2A_RACE3'_inner	GACGATGAAGAACCAGTACGA
MT2A_RACE3'_outer	GCATGTGGTTGTGGATCT
CUBD_RACE3'_inner	TGGAAGGGGTGACGTCATA
CUBD_RACE3'_outer	GGTTAGAAAGCATATCTCCA

2-3-9) Clonages des ADNc pleines longueurs par la méthode Gateway (Invitrogen)

Un adaptateur spécifique est ajouté par PCR de part et d'autre de la phase ouverte de lecture (ORF) de chaque ADNc qui doit être cloné. La séquence des amorces utilisées pour l'amplification est donnée dans le tableau 18. Le produit de PCR est ensuite purifié à l'aide du kit « GeneClean Turbo » (MP BIomedicals) selon les spécifications du fournisseur.

Le produit de PCR purifié est introduit dans le vecteur pDNR207 (Invitrogen) sous l'action de l'enzyme BP clonase (Invitrogen) en respectant les proportions et les conditions spécifiées. La réaction est incubée à 25°C pendant toute la nuit. Elle est ensuite stoppée par incubation pendant 10 min à 37°C avec 1 µL de Protéinase K. Cinq µL de la « réaction BP » ont été utilisés pour transformer les bactéries compétentes Top10 (Invitrogen). La sélection des transformants se fait par la gentamycine (10 mg L⁻¹). Une dizaine de bactéries

transformées sont testées par PCR en utilisant les amorces attL1F : 5'-TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC-3' et attL2R : 5'-GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC-3' (Ni *et al.*, 2007). Une colonie positive est repiquée sur le milieu sélectif, puis une minipréparation de l'ADN plasmidique est réalisée à partir d'une culture liquide ensemencée à partir de cette colonie.

Tableau 18 : Amorces utilisées pour le clonage GATEWAY des ADNc pleines longueurs. Sont représentées en vert, orange et bleu la séquence de l'adaptateur et en jaune la séquence spécifique du gène. Amorce_F : amorce sens, amorce_R : amorce anti-sens.

Nom	Amorce (5'-3')
Hi_MT2A_F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGTTGCGGAGGTTGCAAAAT
Hi_MT2A_R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCATTACAAAGTGAAGGGT
Hi_MT2B_F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGTTGCGGAGGTTGCAAAAT
Hi_MT2B_R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTATTGTCAGGTGAAGGGT
Hi_CUBD_F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGAGGATAAGTGATATTTTCT
Hi_CUBD_R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTAAGATTGATGAGGGAAT
Hi-FER_F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCCTCAAACGCACTCTCT
Hi-FER_R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTAGTTCAGAAGCATCTGGT

Ce plasmide appelé « pENTRY - Nom du gène » est utilisé pour la réaction LR. Cette réaction va servir à transférer l'ADNc du vecteur pENTRY vers un vecteur binaire (pCB2004, Lei *et al.*, 2007 ou pCB406, Ni *et al.*, 2007) qui sera utilisé pour transformer *A. thaliana*.

La réaction LR est réalisée en présence de Topoisomérase I (Invitrogen) pour relaxer le vecteur pENTRY selon les proportions et les spécifications fournies par le fabricant (Invitrogen). La réaction est incubée toute la nuit à 25°C. L'enzyme LR clonase est hydrolysée par incubation pendant 10 min à 37°C avec la protéinase K. Un µL de la réaction LR est utilisé pour transformer par choc thermique les bactéries ultracompétentes Top10 (Invitrogen). La sélection des bactéries transformées se fait sur milieu LB contenant 50 mgL⁻¹ de kanamycine.

A nouveau, comme pour la réaction BP, une colonie positive est repiquée sur le milieu sélectif, puis une minipréparation de l'ADN plasmidique est réalisée à partir d'une culture liquide ensemencée à partir de cette colonie.

Ce plasmide appelé « pDEST - Nom du gène » est utilisé pour transformer la souche d'*Agrobacterium* C58C1 GV3101 pMP90 électrocompétente.

2-3-10) Sélection des mutants d'insertion d'*A. thaliana*

Pour la sélection des plantes homozygotes issues des lignées « mutant d'insertion » de l'Institut SALK, des réactions de PCR ont été réalisées sur l'ADN avec l'amorce Lbb1 : 5'-GCGTGGACCGCTTGCTCAACT-3' spécifique de l'insertion et 2 amorces sens et anti-sens qui sont situées de part et d'autre de l'insertion. La description des amorces est précisée dans le tableau 19.

Tableau 19 : Amorces utilisées pour vérifier la présence de l'insertion sur les ADN des lignées mutant d'insertion d'*A. thaliana*.

Symbole	Insertion	Lignée (NASC)	Amorce sens (5'-3')	Amorce anti-sens (5'-3')
HMA4	SALK_093482	N656769	CCGGTAATACCACTTTCTCCTC	AAGGTTTCGTGGAGTGTGG
PDF1-2b	SALK_086302/SALK_086304	N586302/N586304	TCGACGAAGGTCAGACTACCA	ATTACTAACCAAAAGCTGCAAA
CUBD	SALK_089210	N589210	GGATGCCCTCTAAGCAACAA	AAGAAGAGGAAGGCCAAAGC
MT2A	SALK_059712	N657386	CCATAACACACGGAACATCG	AGATCCACATCCGCAGTTTC
FER1	SALK_055487	N555487	Homozygote fournit par BPMP	
MT2B	SALK_037601/SALK_144899	N537601/N644899	GATCCACAACCACAGCTTCC	GGACAAAGATCGTTGACAGC

2-4) Mesure de la longueur de la racine primaire

Après 13 jours de culture, les boîtes de pétri contenant 10 à 12 plantules d'*A. thaliana* sont scannées avec une résolution de 450 dpi. L'image du système racinaire de chaque plante ainsi obtenue est ensuite analysée à l'aide du logiciel Optimas version 6.1 (Media Cybernetics, MD, USA). Les données sont ensuite exportées vers Excel pour finaliser les graphiques.

2-5) Dosage du Pb

2-5-1) Hydrolyse acide

- Feuilles et racines

Les feuilles et les racines (3 répétitions par échantillon) sont lavées successivement 2 fois 15 s avec une solution de CaSO₄ 0,2 mM et une fois 15 s avec de l'H₂O. Ensuite, les échantillons sont séchés dans une étuve à 70°C pendant au moins 3 jours (masse constante). Les échantillons sont broyés finement à l'aide de l'azote liquide dans un mortier. Ensuite, un maximum de 200 mg d'échantillons sont traités selon le protocole de l'hydrolyse acide de Temminghoff & Houba (2004).

- Sols

Les échantillons de sols (3 répétitions par échantillon) sont séchés à température ambiante puis broyés finement à l'aide d'un mortier (granulométrie < 180 µm). Ils sont

soumis à une hydrolyse acide selon le protocole décrit par Smouni *et al.* (2010).

2-5-2) Détermination de la concentration en Pb

La concentration en Pb est déterminée par ICP-AES (Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry; Ultima2 JY) selon la méthode décrite par Margui *et al.* (2005). Les échantillons (3 répétitions par échantillon) ont été analysés par la plateforme d'analyses biochimiques du CNRST à Rabat, Maroc.

2-6) Analyse statistique

Toutes les données sont des moyennes \pm l'écart type du aux répétitions à l'intérieur d'une même expérience. Les données proviennent d'une expérience représentative de 2 ou 3 répétitions biologiques indépendantes. Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel Statistica (Statsoft, Tulsa, OK, USA). L'analyse de variance a été faite avec une ANOVA bi-factorielle avec un test LSD Post Hoc pour mesurer les différences.

2-7) Analyse bio-informatique

Les séquences sont nettoyées des parties vectorielles en utilisant le logiciel Vecscreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/>). Ensuite, les séquences sont comparées à celles contenues dans les bases de données grâce au logiciel BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) en réalisant un blastn.

Les phases ouvertes de lecture sont recherchées avec le logiciel ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). On réalise un blastp sur les différentes ORF trouvées par le logiciel pour déterminer laquelle est la plus probable.

Le recouvrement des séquences est réalisé avec le logiciel CAP3 (http://pbil.univ-lyon1.fr/cgi-bin/run_cap3).

Les amorces ont été dessinées grâce au logiciel Amplify v3.1.4, (<http://www.engels.genetics.wisc.edu/amplify/>).

Les alignements de séquences et les arbres phylogénétiques qui en découlent, sont réalisés avec le logiciel Sequence Viewer version 6.5.4 (CLC Bio).

Références Bibliographiques

- Abdel-Ghany, S.E., Burkhead, J.L., Gogolin, K.A., Andrés-Colás, N., Bodecker, J.R., Puig, S., Peñarrubia, L., and Pilon, M.** (2005). AtCCS is a functional homolog of the yeast copper chaperone Ccs1/Lys7. *FEBS Lett.* 579, 2307-2312.
- Abercrombie, J.M., Halfhill, M.D., Ranjan, P., Rao, M.R., Saxton, A.M., Yuan, J.S., and Stewart, C.N.** (2008). Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* plants to As (V) stress. *BMC Plant Biol.* 8, 87-101.
- Ahsan, N., Renaut, J., and Komatsu, S.** (2009). Recent developments in the application of proteomics to the analysis of plant responses to heavy metals. *Proteomics* 9, 2602-2621.
- Agunbiade, F.O., Olu-Owolabi, B.I., and Adebowale, K.O.** (2009). Phytoremediation potential of *Eichornia crassipes* in metal-contaminated coastal water. *Bioresour. Technol.* 100, 4521-4526.
- Alirzayeva, E.G. Shirvani, T.S., Yazıcı, M.A., Alverdiyeva, S.M., Shukurov, E.S., Öztürk, L., Ali-zade, V.M., and Çakmak, İ.** (2006) Heavy metal accumulation in *Artemisia* and foliaceous lichen species from the Azerbaijan flora. *For. Snow Landsc. Res.* 80, 339-348.
- Alsheikh, M.K., Heyen, B.J., and Randall, S.K.** (2003). Ion binding properties of the dehydrin ERD14 are dependent upon phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 278, 40882-40889.
- Arazi, T., Sunkar, R., Kaplan, B., and Fromm, H.** (1999). A tobacco plasma membrane calmodulin-binding transporter confers Ni^{2+} tolerance and Pb^{2+} hypersensitivity in transgenic plants. *Plant J.* 20, 171-182.
- Baker, A.J.M., and Brooks, R.R.** (1989). Terrestrial higher plants which hyper-accumulate metallic elements - A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* 1: 81-126.
- Balzi, E., and Goffeau, A.** (1994). Genetics and biochemistry of yeast multidrug resistance. *Biochim. Biophys Acta* 1187, 152-162.
- Banuelos, G.S., Zambruski, S., and Mackey, B.** (2000). Phytoextraction of selenium from soils irrigated with selenium-laden effluent. *Plant Soil* 224, 251-258.
- Bar-Or, C., Czosnek, H., and Koltai, H.** (2007). Cross-species microarray hybridizations: a developing tool for studying species diversity. *Trends Genet.* 23, 200-207.
- Barbaroux, R., Meunier, N., Mercier, C., Taillard, V., Morel, J.L., Simonnot, M.O., and Blais, J.F.** (2009). Chemical leaching of nickel from the seeds of the metal hyperaccumulator plant *Alyssum murale*. *Hydrometallurgy* 100, 10-14.
- Barcelo, J. & Poschenrieder C** (1990). Plant water relations as affected by heavy metal stress : A review. *J. Plant Nutr.* 13, 1-37.

- Becher, M., Talke, I.N., Krall, L., and Krämer, U.** (2004). Cross-species microarray transcript profiling reveals high constitutive expression of metal homeostasis genes in shoots of the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant J.* *37*, 251-268.
- Békésiová, B., Hraska, S., Libantová, J., Moravčíková, J., and Matusíková, I.** (2008). Heavy-metal stress induced accumulation of chitinase isoforms in plants. *Mol. Biol. Rep.* *35*, 579-588.
- Berardini, T.Z., Mundodi, S., Reiser, R., Huala, E., Garcia-Hernandez, M., Zhang, P., Mueller, L.M., Yoon, J., Doyle, A., Lander, G., Moseyko, N., Yoo, D., Xu, I., Zoeckler, B., Montoya, M., Miller, N., Weems, D., and Rhee, S.Y.** (2004). Functional annotation of the *Arabidopsis* genome using controlled vocabularies. *Plant Physiol.* *135*, 1-11.
- Bernard D.G., Cheng, Y., Zhao, Y., and Balk, J.** (2009). An allelic mutant series of ATM3 reveals its key role in the biogenesis of cytosolic iron-sulfur proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* *151*, 590-602.
- Bertani, G.** (1951). Studies on lysogenesis I. : The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *62*, 293-300.
- Bhargava, A., Carmona, F.F., Bhargava, M., and Srivastava, S.** (2012). Approaches for enhanced phytoextraction of heavy metals. *J. Environ. Manage.* *105*, 103-120.
- Bhuiyan, M.S.U., Min, S.R., Jeong, W.J., Sultana, S., Choi, K.S., Lee, Y., and Liu, J.R.** (2011). Overexpression of AtATM3 in *Brassica juncea* confers enhanced heavy metal tolerance and accumulation. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* , *107*, 69-77.
- Boularbah, A., Schwartz, C., Bitton, G., Abouddrar, W., Ouhammou, A., and Morel, J.L.** (2006). Heavy metal contamination from mining sites in South Morocco: 2. Assessment of metal accumulation and toxicity in plants. *Chemosphere* *63*, 811-817.
- Bovet, L., Eggmann, T., Meylan-Bettex, M., Polier, M., Kammer, P., Marin, E., Feller, U., and Martinoia, E.** (2003). Transcript levels of *AtMRPs* after cadmium treatment : induction of *AtMRP3*. *Plant Cell Environ.* *26*, 371-381.
- Bovet, L., Feller, U., and Martinoia, E.** (2005). Possible involvement of plant ABC transporters in cadmium detoxification: a cDNA sub-microarray approach. *Environ. Int.* *31*, 263-267.
- BRGM** (2010). Qu'elles techniques pour quels traitements ?- Analyse coûts bénéfices.
- Briat, J.F., and Lebrun, M.** (1999). Plant responses to metal toxicity. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Series III Sciences de la Vie* *322*, 43-54.
- Broughton, W.J., and Dilworth, M.J.** (1971). Control of Leghaemoglobin synthesis in

- snake beans. *Biochem. J.* 125, 1075-1080.
- Burton, K.W., Morgan, E., and Roig, A.** (1984). The influence of heavy metals upon the growth of sitka-spruce in South Wales forests II Greenhouse experiments. *Plant Soil* 78, 271-282.
- Cao, S., Chen, Z., Liu, G., Jiang, L., Yuan, H., Ren, G., Bian, X., Jian, H., and Ma, X.** (2009). The Arabidopsis Ethylene-Insensitive 2 gene is required for lead resistance. *Plant Physiol. Biochem.* 47, 308-312.
- Cenkci, S., Hakkı Cigerci, I., Yıldız, M., Özay, C., Bozdog, A., and Terzi, H.** (2010). Lead contamination reduces chlorophyll biosynthesis and genomic template stability in *Brassica rapa* L. *Environ. Exp. Bot.* 67, 467-473.
- Chaffai, R., and Koyama, H.** (2011). Heavy Metal Tolerance in *Arabidopsis thaliana*. In *Advances in Botanical Research* 60, 1-49.
- Chan, C.W., Schorrak, L.M., Smith, R.K., Bent, A.F., and Sussman, M.R.** (2003). A cyclic nucleotide-gated ion channel, CNGC2, is crucial for plant development and adaptation to calcium stress. *Plant Physiol.* 132, 728-731.
- Chasseaud, L.F.** (1979). The role of glutathione and glutathione S-transferase in the metabolism of chemical carcinogens and other electrophilic agents. In *Advances in cancer research* 29, 175-244.
- Chatterjee, C., Dube, B.K., Sinha, P. and Srivastava, P.** (2004). Detrimental effects of lead phytotoxicity on growth, yield and metabolism of rice. *Soil Sci. Plant Anal.* 35, 255-265.
- Chehregani, A., Noori, M., and Yazdi, H.L.** (2009). Phytoremediation of heavy-metal-polluted soils: screening for new accumulator plants in Angouran mine (Iran) and evaluation of removal ability. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1349-1353.
- CITEPA** (2012). Inventaire des émissions de polluants atmosphériques et de gaz à effet de serre en France. Séries sectorielles et analyses étendues.
- Clemens, S.** (2001). Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* 212, 475-486.
- Clough, S.J., and Bent, A.F.** (1998). Floral dip : a simple method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16, 735-743.
- Cobbett, C., and Goldsbrough, P.** (2002). Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 159-182.
- Colangelo, E.P., and Guerinot, M.L.** (2006). Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 322-330.
- Cunningham, S.D., Berti, W.R., and Huang, J.W.** (1995). Phytoremediation of

- contaminated soils. *Trends Biotechnol.* 13, 393-397.
- Del Río-Celestino, M., Font, R., Moreno-Rojas, R., and De Haro-Bailón, A.** (2006). Uptake of lead and zinc by wild plants growing on contaminated soils. *Indus. Crops Prod.* 24, 230-237.
- Didierjean, L., frendo, P., Nasser, W., genot G., Marivet J., and Burkard, G.** (1996). Heavy-metal-responsive genes in maize : identification and comparizon of their expression upon various forms of abiotic stress. *Biomed. Life Sci.* 1, 1-8.
- Donaldson, R.P., and Luster, D.G.** (1991). Multiple forms of plant Cytochromes P-450. *Am. Soc. Plant Biol.* 96, 669-674.
- Dong, R., Formentin, E., Losseso, C., Carimi, F., Benedetti, P., Terzi, M., and Schiavo, F.L.** (2005). Molecular cloning and characterization of a phytochelatin synthase gene, *PvPCSI*, from *Pteris vittata* L. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32, 527-533.
- Duffus, J.H.** (2002). « Heavy metals »- A meaningless term? *Pure Appl. Chem.* 74, 793-807.
- Durrett, T.P., Gassmann, W., and Rogers, E.E.** (2007). The FRD3-mediated efflux of citrate into the root vasculature is necessary for efficient iron translocation. *Plant Physiol.* 144, 197-205.
- Dushenkov, V., Kumar, P.B.A.N., Motto, H., and Raskin I.** (1995). Rhizofiltration : The use of plants to remove heavy metals from aqueous streams. *Environ. Sci. Technol.* 29, 1239-1245.
- Dushenkov,S., Vasudev,D., Kapulnik,Y., Gleba, D., Fleisher,D., Ting,K.C. and, Burt Ensley, B.** (1997). Removal of uranium from water using terrestrial plants. *Environ. Sci. Technol.* 31, 3468-3474.
- Ebbs, S., Lau, I., Ahner, B., and Kochian, L.** (2002). Phytochelatin synthesis is not responsible for Cd tolerance in the Zn /Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (J. & C. Presl). *Planta* 214, 635-640.
- El Hachimi, M.L., El Founti, L., Bouabdli, A., Saïdi, N., Fekhoui, M., and Tassé, N.** (2007). Pb et As dans des eaux alcalines minières : contamination, comportement et risques (mine abandonnée de Zeïda, Maroc). *Revue des Sciences de l'Eau* 20, 1-13.
- Estrella-Gómez, N., Mendoza-Cózatl, D., Moreno-Sánchez, R., González-Mendoza, D., Zapata-Pérez, O., Martínez-Hernández, A., and Santamaría, J.M.** (2009). The Pb-hyperaccumulator aquatic fern *Salvinia minima* Baker, responds to Pb(2+) by increasing phytochelatin synthesis via changes in SmPCS expression and in phytochelatin synthase activity. *Aquat. Toxicol.* 91, 320-328.

- Frova, C.** (2003). The plant glutathione transferase gene family: genomic structure, functions, expression and evolution. *Physiol. Plant.* 119, 469-479.
- Garland, C., and Wilkins, D.** (1981). Effect of Cadmium on the uptake and toxicity of Lead in *Hordeum vulgare* L. and *Festuca ovina* L. *New Phytol.* 87, 581-593.
- Gertler, C., Gerdt, G., Timmis, K.N., Yakimov, M.M., and Golyshin, P.N.** (2009). Populations of heavy fuel oil-degrading marine microbial community in presence of oil sorbent materials. *J. Appl. Microbiol.* 107, 590-605.
- Gisbert, C., Clemente, R., Navarro-Avinó, J., Baixauli, C., Ginér, A., Serrano, R., Walker, D.J., and Bernal, M.P.** (2006). Tolerance and accumulation of heavy metals by Brassicaceae species grown in contaminated soils from Mediterranean regions of Spain. *Environ. Exp. Bot.* 56, 19-27.
- Gobat, J.M., Aragno, M., and matthey, W.** (1998). Le sol vivant. Bases de pédologie, biologie des sols. Presses polytechniques et universitaires romandes.
- Gravot, A., Lieutaud, A., Verret, F., Auroy, P., Vavasseur, A., and Richaud, P.** (2004). AtHMA3, a plant P_{1B}-ATPase, functions as a Cd/Pb transporter in yeast. *FEBS Lett.* 561, 22-28.
- Grispen, V.M.J., Hakvoort, H.W.J., Blik, T., Verkleij, J.A.C., and Schat, H.** (2011). Combined expression of the Arabidopsis metallothionein MT2b and the heavy metal transporting ATPase HMA4 enhances cadmium tolerance and the root to shoot translocation of cadmium and zinc in tobacco. *Environ. Exp. Bot.* 72, 71-76.
- Guerinot, M.L.** (2000). The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1465, 190-198.
- Gupta, D.K., Nicoloso, F.T., Schetinger, M.R., Rossato, L.V., Pereira, L.B., Castro, G.Y., Srivastava, S., and Tripathi, R.D.** (2009). Antioxidant defense mechanism in hydroponically grown Zea mays seedlings under moderate lead stress. *J. Hazard Mater.* 172, 479-484.
- Gupta, S.C., Sharma, A., Mishra, M., Mishra, R.K., and Chowdhuri, D.K.** (2010). Heat shock proteins in toxicology: how close and how far? *Life Science* 86, 377-384.
- Guo, W.J., Bundithya, W., and Goldsbrough, P.B.** (2003). Characterization of the Arabidopsis metallothionein gene family: tissue-specific expression and induction during senescence and in response to copper. *New Phytol.* 159, 369-381.
- Guo, W.J., Meetam, M., and Goldsbrough, P.B.** (2008). Examining the specific contributions of individual Arabidopsis metallothioneins to copper distribution and metal tolerance. *Plant Physiol.* 146, 1697-1706.

- Hall, J.L., and Williams, L.E.** (2003). Transition metal transporters in plants. *J. Exp. Bot.* *54*, 2601-2613.
- Hammet, F.S.** (1928). Studies in the biology of metals. *Protoplasma* *5*, 535-542.
- Hammond, J.P., Bowen, H.C., White, P.J., Mills, V., Pyke, K.A., Baker, A.J., Whiting, S.N., May, S.T., and Broadley, M.R.** (2006). A comparison of the *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi arvense* shoot transcriptomes. *New Phytol.* *170*, 239-260.
- Hanikenne, M., Talke, I.N., Haydon, M.J., Lanz, C., Nolte, A., Motte, P., Kroymann, J., Weigel, D., and Krämer, U.** (2008). Evolution of metal hyperaccumulation required cis-regulatory changes and triplication of HMA4. *Nature* *453*, 391-395.
- Hassinen, V.H., Tervahauta, A.I., Schat, H., and Kärenlampi, S.O.** (2011). Plant metallothioneins - metal chelators with ROS scavenging activity? *Plant Biol. (Stuttg)* *13*, 225-232.
- Hatzios, K.** (1991). Biotransformation of herbicides in higher plants. In *Environmental Chemistry Herbicides*, Grover, R., and Cessna, A.J. (eds), vol II, 141-186.
- Haydon, M.J., and Cobbett, C.S.** (2007). Transporters of ligands for essential metal ions in plants. *New Phytol.* *174*, 499-506.
- He, Z.L., Yang, X.E., and Stoffella, P.J.** (2005). Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *J. Trace Elem. Med. Biol.* *19*, 125-140.
- Hettiarachchi, G.M., and Pierzynski, G.M.** (2002). In situ stabilization of soil lead using phosphorus and manganese oxide: influence of plant growth. *J. Environ. Qual.* *31*, 564-572.
- Hincha, D.K., and Thalhammer, A.** (2012). LEA proteins : IDPs with versatile functions in cellular dehydration tolerance. *Biochem. Soc. Trans.* *40*, 1000-1003.
- Hua, D., Wang, C., He, J., Liao, H., Duan, Y., Zhu, Z., Guo, Y., Chen, Z., and Gong, Z.** (2012). A plasma membrane receptor kinase, GHR1, mediates abscisic acid- and hydrogen peroxide-regulated stomatal movement in *Arabidopsis*. *Plant Cell* *24*, 2546-2561.
- Huang, G.Y., and Wang, Y.S.** (2009). Expression analysis of type 2 metallothionein gene in mangrove species (*Bruguiera gymnorhiza*) under heavy metal stress. *Chemosphere* *77*, 1026-1029.
- Huang, J.W., and Cunningham, S.D.** (1996). Lead phytoextraction: species variation in lead uptake and translocation. *New Phytol.* *134*, 75-84.
- Hussain, D., Haydon, M.J., Wang, Y., Wong, E., Sherson, S.M., Young, J., Camakaris, J., Harper, J.F., and Cobbett, C.S.** (2004). P-type ATPase heavy metal transporters

- with roles in essential zinc homeostasis in Arabidopsis. *Plant Cell* 16, 1327-339.
- Inouhe, M.** (2005). Phytochelatins. *Braz. J. Plant Physiol.* 17, 65-78.
- INSERM (2008).** Expertise collective, Saturnisme. Quelles stratégies de dépistage chez l'enfant?
- Islam, E., Liu, D., Li, T., Yang, X., Jin, X., Mahmood, Q., Tian, S., and Li, J.** (2008). Effect of Pb toxicity on leaf growth, physiology and ultrastructure in the two ecotypes of *Elsholtzia argyi*. *J. Hazard. Mater.* 154, 914-926.
- Kaplan, B., Sherman, T., and Fromm, H.** (2007). Cyclic nucleotide-gated channels in plants. *FEBS Lett.* 581, 2237-2246.
- Kim, S., Kang, J.Y., Cho, D.I., Park, J.H., and Kim, S.Y.** (2004). ABF2, an ABRE-binding bZIP factor, is an essential component of glucose signaling and its overexpression affects multiple stress tolerance. *Plant J.* 40, 75-87.
- Kim, D.Y., Bovet, L., Kushnir, S., Noh, E.W., Martinoia, E., and Lee, Y.** (2006). AtATM3 Is Involved in Heavy Metal Resistance in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 140, 922-932.
- Kim, D.Y., Bovet, L., Maeshima, M., Martinoia, E., and Lee, Y.** (2007). The ABC transporter AtPDR8 is a cadmium extrusion pump conferring heavy metal resistance. *Plant J.* 50, 207-218.
- Kim, Y.Y., Yang, Y.Y., and Lee, Y.** (2002). Pb and Cd uptake in rice roots. *Physiol. Plant.* 116, 368-372.
- Klaassen, C.D., Liu, J., and Choudhuri, S.** (1999). Metallothionein : an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 267-294.
- Koepe, D. E.** (1977). The uptake, distribution and effect of cadmium and lead in plants. *Sci. Total Environ.* 7, 197-206.
- Komatsu, S., Konishi, H., and Hashimoto, M.** (2007). The proteomics of plant cell membranes. *J. Exp. Bot.* 58, 103-112.
- Kopittke, P.M., Asher, C.J., Kopittke, R.A., and Menzies, N.W.** (2007). Toxic effects of Pb²⁺ on growth of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Environ. Pollut.* 150, 280-287.
- Kovermann, P., meyer, S., Hörtensteiner, S., Picco, C., Scholtz-Starke, J., Ravera, S., Lee, Y., and Martinoia, E.** (2007). The Arabidopsis vacuolar malate channel is a member of the ALMT family. *Plant J.* 52, 1169-1180.
- Krämer, U., Talke, I.N., and Hanikenne, M.** (2007). Transition metal transport. *FEBS Lett.* 581, 2263-2272.
- Krämer, U.** (2010). Metal hyperaccumulation in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61, 517-534.

- Krüger, C., Berkowitz, O., Stephan, U.W., and Hell, R.** (2002). A metal-binding member of the late Embryogenesis Abundant protein family transports iron in the phloem of *Ricinus communis* L. *J. Biol. Chem.* 277, 25062-25069.
- Lagerwerff, J.V.** (1971). Uptake and Cadmium Lead and Zinc by radish from soil and air. *Soil Science* 111, 129-133.
- Le Cloirec, P., and Andrès, P.** (2005) Bioremediation of Heavy Metals using Microorganisms. In *Bioremediation of aquatic and terrestrial ecosystems*. Fingerman, M., and Nagabhushanam, R. (eds), 97-140.
- Lee, J., Shim, D., Song, W.Y., Hwang, I., and Lee, Y.** (2004). Arabidopsis metallothioneins 2a and 3 enhance resistance to cadmium when expressed in *Vicia faba* guard cells. *Plant Mol. Biol.* 54, 805-815.
- Lee, M., Lee, K., Lee, J., Noh, E.W., and Lee, Y.** (2005). AtPDR12 contributes to lead resistance in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 138, 827-836.
- Lei, Z.Y., Zhao, P., Cao, M.J., Cui, R., Chen, X., Xiong, L.Z., Zhang, Q.F., Oliver, D.J., and Xiang, C.B.** (2007). High-throughput Binary Vectors for Plant Gene Function Analysis. *J. Integr. Plant Biol.* 49, 556-567.
- Liao, S.W., and Chang, W.L.** (2004). Heavy Metal Phytoremediation by Water Hyacinth at Constructed Wetlands in Taiwan. *J. Aquat. Plant Manage* 42, 60-68.
- Lin, Y.F., and Aarts, M.G.** (2012). The molecular mechanism of zinc and cadmium stress response in plants. *Cell Mol. Life Sci.* 69, 3187-3206.
- Liu, D., Narasimham, M.L., Raghothama, K.G., Hasegawa, P.M., and Bressan R.A.** (1995). Fine structure and function of the osmotin gene promoter. *Plant Mol. Biol.*, 29, 1015-1026.
- Liu, D., Li, T.Q., Jin, X.F., Yang, X.E., Islam, E., and Mahmood, Q.** (2008). Lead induced changes in the growth and antioxidant metabolism of the lead accumulating and non-accumulating ecotypes of *Sedum alfredii*. *J. Integr. Plant Biol.* 50, 129-140.
- Liu, T., Liu, S., Guan, H., Ma, L., Chen, Z., Gu, H., and Qu, L.J.** (2009). Transcriptional profiling of Arabidopsis seedlings in response to heavy metal lead (Pb). *Environ. Exp. Bot.* 67, 377-386.
- Lombi, E., Tearall, K.L., Howarth, J.R., Zhao, F.J., Hawkesford, M.J., and McGrath, S.P.** (2002). Influence of iron status on cadmium and zinc uptake by different ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiol.* 128, 1359-1367.
- Louie, M., Kondor, N., and De Witt J.G.** (2003). Gene expression in cadmium-tolerant *Datura innoxia* : detection and characterization of cDNAs induced in response to Cd²⁺. *Plant*

Mol. Biol. 52, 81-89.

Ma, L.Q., Komar, K.M., Tu, C., Zhang, W., Cai, Y., and Kennelley, E.D. (2001). A fern that hyperaccumulates arsenic. *Nature* 409, 579.

Ma, W., Ali, R., and Berkowitz, G.A. (2006). Characterization of plant phenotypes associated with loss-of-function of AtCNGC1, a plant cyclic nucleotide gated cation channel. *Plant Physiol. Biochem.* 44, 494-505.

Marguí, E., Queralt, I., Carvalho, M.L., and Hidalgo, M. (2005). Comparison of EDXRF and ICP-OES after microwave digestion for element determination in plant specimens from an abandoned mining area. *Anal. Chim. Acta* 549, 197-204.

Malecka, A., Jarmuszkiewicz, W., and Tomaszewska, B. (2001). Antioxidative defense to lead stress in subcellular compartments of pea root cells. *Acta Biochim. Pol.* 48, 687-688.

Mari, S., Gendre, D., Pianelli, K., Ouerdane, L., Lobinski, R., Briat, J.F., Lebrun, M., and Czernic, P. (2006). Root-to-shoot long-distance circulation of nicotianamine and nicotianamine-nickel chelates in the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *J. Exp. Bot.* 57, 4111-4122.

Martinoia, E., Klein, M., Geisler, M., Bovet, L., Forestier, C., Kolukisaoglu, U., Müller-Röber, B., and Schulz, B. (2002). Multifunctionality of plant ABC transporters-more than just detoxifiers. *Planta* 214, 345-355.

Mattina, M.I., Lannucci-Berger, W., Musante, C., and White, J.C. (2003). Concurrent plant uptake of heavy metals and persistent organic pollutants from soil. *Environ. Pollut.* 124, 375-378.

McGrath, S.P., and Zhao, F.J. (2003). Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14, 277-282.

McGrath, S.P., Shen, Z.G., and Zhao, F.J. (1997). Heavy metal uptake and chemical changes in the rhizosphere of *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi ochroleucum* grown in contaminated soils. *Plant Soil* 188, 153-159.

McGrath, S.P., Lombi, E., Gray, C.W., Caille, N., Dunham, S.J., and Zhao, F.J. (2006). Field evaluation of Cd and Zn phytoextraction potential by the hyperaccumulators *Thlaspi caerulescens* and *Arabidopsis halleri*. *Environ. Pollut.* 141, 115-125.

Michel, J.C. (2007). Economie du plomb. Ecomine juillet-Août 2007.

Melendo, M., Benitez, E., and Nogales, R. (2002). Assessment of the feasibility of endogenous Mediterranean species for phytoremediation of lead-contaminated areas. *Fresenius Environ. Bull.* 11, 1105-1109.

Mills, R.F., Krijger, G.C., Baccarini, P.J., Hall, J.L., and Williams, L.E. (2003).

Functional expression of AtHMA4, a P_{1B}-type ATPase of the Zn/Co/Cd/Pb subclass. The Plant Journal 35, 164-176.

Mineral Commodity Summaries (2011). US Geological Survey

Mirouze, M., Sels, J., Richard, O., Czernic, P., Loubet, S., Jacquier, A., François, I.E., Cammue, B.P., Lebrun, M. (2006). A putative novel role for plant defensins: a defensin from the zinc hyper-accumulating plant, *Arabidopsis halleri*, confers zinc tolerance. Plant J. 47, 329-342.

Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15, 473-497.

Nahal, I. (2004). La désertification dans le monde : Causes, Processus, Conséquences, Lutte. L'Harmattan (ed). pp 150

Narusaka, Y., Narusaka, M., Seki, M., Umezawa, T., Ishida, J., Nakajima, M., Enju, A., and Shinozaki, K. (2004). Crosstalk in the responses to abiotic and biotic stresses in *Arabidopsis*: analysis of gene expression in cytochrome P450 gene superfamily by cDNA microarray. Plant Mol. Biol. 55, 327-342.

Ni, W.S., Lei, Z.Y., Chen, X., Oliver, D.J., and Xiang, C.B. (2007). Construction of a plant transformation-ready expression cDNA library for *Thellungiella halophila* using recombination cloning. J. Integr. Plant Biol. 49, 1313-1319.

Nogales, R., and Benítez, E. (2006). Absorption of zinc and lead by *Dittrichia viscosa* grown in a contaminated soil amended with olive-derived wastes. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 76, 538-544.

Odjegba, V.J., and Fasidi, I.O. (2007). Phytoremediation of heavy metals by *Eichhornia crassipes*. Environmentalist 27, 349-355.

Oliveros, J.C. (2007). VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>.

Ó Lochlainn, S., Bowen, H.C., Fray, R.G., Hammond, J.P., King, G.J., White, P.J., Graham, N.S., and Broadley, M.R. (2011). Tandem quadruplication of HMA4 in the zinc (Zn) and cadmium (Cd) hyperaccumulator *Noccaea caerulescens*. PLoS ONE 6, e17814.

Olsen, A.N., Ernst, H.A., Leggio, L.L., and Skriver, K. (2005). NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. Trends Plant Sci. 10, 79-87.

Ouerdane, L., Mari, S., Czernic, P., Lebrun, M., and Lobiński, R. (2006). Speciation of non-covalent nickel species in plant tissue extracts by electrospray Q-TOFMS/MS after

- their isolation by 2D size exclusion-hydrophilic interaction LC (SEC-HILIC) monitored by ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* *21*, 676-683.
- Palmer, C.M., and Guerinot, M.L.** (2009). Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Nat. Chem. Biol.* *5*, 333-340.
- Parys, E., Romanowska, E., Siedlecka, M., and Poskuta, J.W.** (1998). The effect of lead on photosynthesis and respiration in detached leaves and in mesophyll protoplasts of *Pisum sativum*. *Acta Physiol. Plant.* *20*, 312-323.
- Patra, M., Bhowmik, N., Bandopadhyay, B., and Sharma, A.** (2004). Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. *Environ. Exp. Bot.* *52*, 199-223.
- Papoyan, A., and Kochian, L.V.** (2004). Identification of *Thlaspi caerulescens* genes that may be involved in heavy metal hyperaccumulation and tolerance. Characterization of a novel heavy metal transporting ATPase. *Plant Physiol.* *136*, 3814-823.
- Perfus-Barbeoch, L., Leonhardt, N., Vavasseur, A., and Forestier, C.** (2002). Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *Plant J.* *32*, 539-548.
- Peuke, A.D., and Rennenberg, H.** (2005). Phytoremediation. *EMBO Rep.* *6*, 497-501.
- Piechalak, A., Tomaszewska, B., Baralkiewicz, D., and Malecka, A.** (2002). Accumulation and detoxification of lead ions in legumes. *Phytochemistry* *60*, 153-162.
- Pilon-Smits, E.** (2005). Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Biol.* *56*, 15-39.
- Poschenrieder, C., Bech, J., Llugany, M., Pace, A., Fenes, E., and Barcelo, J.** (2001). Copper in plant species in a copper gradient in Catalonia (North East Spain) and their potential for phytoremediation. *Plant Soil* *230*, 247-256.
- Pourrut, B., Perchet, G., Silvestre, J., Cecchi, M., Guisresse, M., and Pinelli, E.** (2008). Potential role of NADPH-oxidase in early steps of lead-induced oxidative burst in *Vicia faba* roots. *J. Plant Physiol.* *165*, 571-579.
- Pourrut, B., Shahid, M., Dumat, C., Winterton, P., and Pinelli, E.** (2011). Lead uptake, toxicity, and detoxification in plants. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* *213*, 113-136.
- Rauser, W.E.** (1995). Phytochelatins and related peptides. Structure, biosynthesis, and function. *Plant Physiol.* *109*, 1141-1149.
- Rauser, W.E.** (1999). Structure and function of metal chelators produced by plants. *Cell Biochem. Biophys.* *31*, 19-48.
- Reddy, A.M., Kumar, S.G., Jyothsnakumari, G., Thimmanaik, S., and Sudhakar, C.** (2005). Lead induced changes in antioxidant metabolism of horsegram (*Macrotyloma*

- uniflorum (Lam.) Verdc.) and bengalgram (*Cicer arietinum* L.). *Chemosphere* 60, 97-104.
- Reeves, R.D., and Brooks, R.R.** (1983). Hyperaccumulation of lead and zinc by two metallophytes from mining areas of Central Europe. *Environ. Pollut.*, 31 277-285.
- Reeves, R.D., Schwartz, C., and Morel, J.L.** (2001). Distribution and Metal-Accumulating Behavior of *Thlaspi caerulescens* and Associated Metallophytes in France. *International J. Phytorem.*, 3, 145-172.
- Rigola, D., Fiers, M., Vurro, E., and Aarts, M.G.** (2006). The heavy metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* expresses many species-specific genes, as identified by comparative expressed sequence tag analysis. *New Phytol.* 170, 753-765.
- Robinson, B.H., Brooks, R.R., Howes, A.W., Kirkman, J.H., and Gregg, P.E.H.** (1997). The potential of the high-biomass nickel hyperaccumulator *Berkheya coddii* for phytoremediation and phytomining. *J. Geochem. Explor.* 60, 115-126.
- Romanowska, E., Igamberdiev, A. U., Parys, E., and Gardeström, P.** (2002). Stimulation of respiration by Pb²⁺ in detached leaves and mitochondria of C3 and C4 plants. *Physiol. Plant.* 116, 148–154.
- Roosens, N.H., Leplae, R., Bernard, C., and Verbruggen, N.** (2005). Variations in plant metallothioneins: the heavy metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* as a study case. *Planta* 222, 716-729.
- Roosens, N.H., Willems, G., and Saumitou-Laprade, P.** (2008). Using *Arabidopsis* to explore zinc tolerance and hyperaccumulation. *Trends Plant Sci.* 13, 208-215.
- Rozen, S., and Skaletsky, J.** (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Human Press, Totowa N.J., 365-386.
- Rugh, C.L., Wilde, H.D., Stack, N.M., Thompson, D.M., Summers, A.O., and Meagher, R.B.** (1996). Mercuric ion reduction and resistance in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants expressing a modified bacterial merA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 3182-3187.
- Ruley, A.T., Sharma, N.C., Sahi, S.V., Singh, S.R., and Sajwan, K.S.** (2006). Effects of lead and chelators on growth, photosynthetic activity and Pb uptake in *Sesbania drummondii* grown in soil. *Environ. Pollut.* 144, 11-18.
- Sahr, T., Voigt, G., Paretzke, H.G., Schramel, P., and Ernst, D.** (2004). Caesium-affected gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* 165, 747-754.
- Sarowar, S., Kim, Y.J., Kim, E.N., Kim, K.D., Hwang, B.K., Islam, R., and Shin, J.S.**

- (2005). Overexpression of a pepper basic pathogenesis-related protein 1 gene in tobacco plants enhances resistance to heavy metal and pathogen stresses. *Plant Cell. Rep.* 24, 216-224.
- Sasaki, A., Yamaji, N., Yokosho, K., and Ma, J.F.** (2012). Nramp5 is a major transporter responsible for Manganese and Cadmium uptake in rice. *Plant Cell* 24, 2155-2167.
- Schat, H., Llugany, M., VOOiJS, R., Hartley-Whitaker, J., and Bleeker, P.M.** (2002). The role of phytochelatins in constitutive and adaptive heavy metal tolerances in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator metallophytes. *J. Exp. Bot.* 53, 2381-2392.
- Schuler, M., and Bauer, P.** (2011). Heavy Metals Need Assistance: The Contribution of Nicotianamine to Metal Circulation Throughout the Plant and the Arabidopsis NAS Gene Family. *Front. Plant. Sci.* 2, 1-5.
- Seregin, I.V., and Ivanov, V.B.** (1997). Histochemical investigations of cadmium and lead distribution in plants. *Russian Journal of Plant Physiology* 56, 791-796.
- Seregin, I.V., & Ivanov, V.B.** (2001). Physiological Aspects of Cadmium and Lead Toxic Effects on Higher Plants. *Russ. J. Plant Physiol.* 48, 523-544.
- Seregin, I.V., Shpigun, L.K., and Ivanov, V.B.** (2004). Distribution and toxic effects of cadmium and lead on maize roots. *Russ. J. Plant Physiol.* 51, 525-533.
- Settle, D.M., and Patterson, C.C.** (1980). Lead in albacore : guide to lead pollutions in Americans. *Science* 207, 1167-1176.
- Shahid, M., Pinelli, E., Pourrut, B., Silvestre, J., and Dumat, C.** (2011). Lead-induced genotoxicity to *Vicia faba* L. roots in relation with metal cell uptake and initial speciation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 78-84.
- Sharma, R., Rensing, C., Rosen, B.P., and Mitra, B.** (2000). The ATP hydrolytic activity of purified ZntA, a Pb(II)/Cd(II)/Zn(II)-translocating ATPase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 275, 3873-3878.
- Sharma, P., and Dubey, R.S.** (2005). Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiol.* 17, 35-52.
- Shiraishi, E., Inouhe, M., Joho, M., and Tohoyama, H.** (2000). The cadmium-resistant gene, CAD2, which is a mutated putative copper-transporter gene (PCA1), controls the intracellular cadmium-level in the yeast *S. cerevisiae*. *Curr. Genet.* 37, 79-86.
- Siemens, J.** (2011) *Hirschfeldia* in Wild crop relatives: Genomic and breeding resources Oilseeds, Ed Kole, C. 171-176.
- Smouni, S.A., Ater, A.M., Auguy, A.F., Laplaze, L.L., El Mzibri, E.M.M., Berhada, B.F., Filali-Maltouf, F.M.K., and Doumas, D.P.** (2010). Evaluation de la contamination par

les éléments-traces métalliques dans une zone minière du Maroc oriental. Cah. Agric. 19, 1-7.

- Srivastava, A.K., Venkatachalam, P., Raghothama, K.G., and Sahi, S.V.** (2007). Identification of lead-regulated genes by suppression subtractive hybridization in the heavy metal accumulator *Sesbania drummondii*. *Planta* 225, 1353-1365.
- Sunkar, R., Kaplan, B., Bouché, N., Arazi, T., Dolev, D., Talke, I.N., Maathuis, F.J., Sanders, D., Bouchez, D., and Fromm, H.** (2000). Expression of a truncated tobacco NtCBP4 channel in transgenic plants and disruption of the homologous Arabidopsis CNGC1 gene confer Pb²⁺ tolerance. *Plant J.* 24, 533-542.
- Talke, I.N., Blaudez, D., Maathuis, F.J., and Sanders, D.** (2003). CNGCs: prime targets of plant cyclic nucleotide signalling? *Trends Plant. Sci.* 8, 286-293.
- Talke, I.N., Hanikenne, M., and Krämer, U.** (2006). Zinc-dependent global transcriptional control, transcriptional deregulation, and higher gene copy number for genes in metal homeostasis of the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Physiol.* 142, 148-167.
- Tanhan, P., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, P., and Chaiyarat, R.** (2007). Uptake and accumulation of cadmium, lead and zinc by Siam weed [*Chromolaena odorata* (L.) King & Robinson]. *Chemosphere* 68, 323-329.
- Tehseen, M., Cairns, N., Sherson, S., and Cobbett, C.S.** (2010). Metallochaperone-like genes in *Arabidopsis thaliana*. *Metallomics* 2, 556-564.
- Temminghoff, E.J.M., and Houba, V.J.G.** (2004). Digestion with HNO₃-H₂O₂-HF. Temminghoff E.J.M., Houba V.J.G. (eds). *Plant Analysis Procedures* (second edition). Kluwer Academic Publishers, 16-19.
- Thimm, O., Blaesing, O., Gibon, Y., Nagel, A., Meyer, S., Krüger, P., Selbig, J., Müller, L.A., Rhee, S.Y., and Stitt, M.** (2004) MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant J.* 37, 914-939.
- Thomine, S., Lelièvre, F., Debarbieux, E., Schroeder, J.I., and Barbier-Brygoo, H.** (2003). *AtNRAMP3*, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency. *Plant J.* 34, 685-695.
- Thornton, I., Rautiu, R., and Brush, S.** (2001). Lead exposure to humans and other organisms. In « Lead the facts », IC Consultants Ltd, London, Uk (Ed), 113-142.

- Tommasini, R., Vogt, E., Fromenteau, M., Hörtensteiner, S., Matile, P., Amrhein, N., and Martinoia, E.** (1998). An ABC-transporter of *Arabidopsis thaliana* has both glutathione-conjugate and chlorophyll catabolite transport activity. *Plant J.* *13*, 773-780.
- Tran, L.S., Nakashima, K., Sakuma, Y., Simpson, S.D., Fujita, Y., Maruyama, K., Fujita, M., Seki, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2004). Isolation and functional analysis of *Arabidopsis* stress-inducible NAC transcription factors to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress I promoter. *Plant Cell* *16*, 2481-2498.
- Van de Mortel, J.E., Almar Villanueva, L., Schat, H., Kwekkeboom, J., Coughlan, S., Moerland, P.D., Ver Loren van Themaat, E., Koornneef, M., and Aarts, M.G.** (2006). Large expression differences in genes for iron and zinc homeostasis, stress response, and lignin biosynthesis distinguish roots of *Arabidopsis thaliana* and the related metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiol.* *142*, 1127-1147.
- Van de Mortel, J.E., and Aarts, M.G.** (2006). Comparative transcriptomics - model species lead the way. *New Phytol.* *170*, 199-201.
- Van Hoof, N.A.L.M., Hassinen, V.H., Ballintijn, K.F., Schat, H., Verkleij, J.A.C., Ernst, W.H.O., Karenlampi, S.O., and Tervahauta, A.I.** (2001). Enhanced copper tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke populations from copper mines is associated with increased transcript levels of a 2b-type metallothionein gene. *Plant Physiol.* *126*, 1519-1526.
- Vangronsveld, J., Herzig, R., Weyens, N., Boulet, J., Adriaensen, K., Ruttens, A., Thewys, T., Vassilev, A., Meers, E.** (2009). Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* *16*, 765-794.
- Vara Prasad, M.N., and De Oliveira Freitas, H.M.** (2003). Metal hyperaccumulation in plants: Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electron. J. Biotechnol.* *6*, 285-321.
- Verbruggen, N., Hermans, C., and Schat, H.** (2009). Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. *New Phytol.* *181*, 759-776.
- Verma, S., and Dubey, R.S.** (2003). Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science* *164*, 645-655.
- Verret, F., Gravot, A., Auroy, P., Leonhardt, N., David, P., Nussaume, L., Vavasseur, A., and Richaud, P.** (2004). Overexpression of *AtHMA4* enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant metal tolerance. *FEBS Lett.* *576*, 306-312.
- Verret, F., Gravot, A., Auroy, P., Preveral, S., Forestier, C., Vavasseur, A., and**

- Richaud, P.** (2005). Heavy metal transport by AtHMA4 involves the N-terminal degenerated metal binding domain and the C-terminal His11 stretch. *FEBS Lett.* *579*, 1515-1522.
- Vinocur, B., and Altman, A.** (2005). Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Curr. Opin. Biotechnol.* *16*, 123-132.
- Wang, C.R., Wang, X.-R., Tian, Y., Yu, H.-X., Gu, X.-Y., Du, W.-C. and Zhou, H.** (2008). Oxidative stress, defense response, and early biomarkers for lead-contaminated soil in *Vicia faba* seedlings. *Environ. Toxicol. Chem.* *27*: 970–977.
- Wang, J., Zhao, F.J., Meharg, A.A., Raab, A., Feldmann, J., and McGrath, S.P.** (2002). Mechanisms of arsenic hyperaccumulation in *Pteris vittata*. Uptake kinetics, interactions with phosphate, and arsenic speciation. *Plant Physiol.* *130*, 1552-1561.
- Watt, D.A.** (2003). Aluminium-responsive genes in sugarcane: identification and analysis of expression under oxidative stress. *J. Exp. Bot.* *54*, 1163-1174.
- Weber, M., Harada, E., Vess, C., Roepenack-Lahaye, E., and Clemens, S.** (2004). Comparative microarray analysis of *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis halleri* roots identifies nicotianamine synthase, a ZIP transporter and other genes as potential metal hyperaccumulation factors. *Plant Journal* *37*, 269-281.
- Weber, M., Trampczynska, A., and Clemens, S.** (2006). Comparative transcriptome analysis of toxic metal responses in *Arabidopsis thaliana* and the Cd²⁺-hypertolerant facultative metallophyte *Arabidopsis halleri*. *Plant Cell Environ.* *29*, 950-963.
- White, P.J.** (2000). Calcium channels in higher plants . *BBA Biomembranes* *1465*, 171-189 .
- Williams, L.E., and Mills, R.F.** (2005). P(1B)-ATPases-an ancient family of transition metal pumps with diverse functions in plants. *Trends Plant Sci.* *10*, 491-502.
- Wojas, S., Ruszczyńska, A., Bulska, E., Wojciechowski, M., and Antosiewicz, D.M.** (2007). Ca(2+) -dependent plant response to Pb(2+) is regulated by LCT1. *Environ. Pollut.* *147*, 584-592.
- Wong, C.K., and Cobbett, C.S.** (2009). HMA P-type ATPases are the major mechanism for root-to-shoot Cd translocation in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* *181*, 71-78.
- Wu, X., Xiao, W., Huang, H., Hao, H., Liu, X., Xiaoqing, L., Chen, L., Liang, C., and Liu, C.** (2008). Oxidative stress induced by lead in chloroplast of spinach. *Biol. Trace Elem. Res.* *126*, 257-268.
- Xiao, S., Gao, W., Chen, Q.F., Ramalingam, S., and Chye, M.L.** (2008). Overexpression of membrane-associated acyl-CoA-binding protein ACBP1 enhances lead tolerance in *Arabidopsis*. *Plant J.* *54*, 141-151.

- Xu, Y.F., Zhou, G.K., Zhou, L., Li, Y.Q., and Liu, J.Y.** (2007). Expression patterns of the rice class I metallothionein gene family in response to lead stress in rice seedlings and functional complementation of its members in lead-sensitive yeast cells. *Chin. Scien. Bull.* 52, 2203-2209.
- Xu, J., Zhang, Y.X., Wei, W., Han, L., Guan, Z.Q., Wang, Z., and Chai, T.Y.** (2008). BjDHNs confer heavy-metal tolerance in plants. *Mol. Biotechnol.* 38, 91-98.
- Yadav, S.K.** (2010). Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African J. Bot.* 76, 167-179.
- Zhigang, A., Cuijie, L., Yuangang, Z., Yejie, D., Wachter, A., Gromes, R., and Rausch, T.** (2006). Expression of BjMT2, a metallothionein 2 from *Brassica juncea*, increases copper and cadmium tolerance in *Escherichia coli* and *Arabidopsis thaliana*, but inhibits root elongation in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *J. Exp. Bot.* 57, 3575-3582.
- Zhu, W., Zhao, D.X., Miao, Q., Xue, T.T., Li, X.Z., and Zheng, C.C.** (2009). *Arabidopsis thaliana* metallothionein, AtMT2a, mediates ROS balance during oxidative stress. *J. Plant Biol.* 52, 585-592.
- Zientara, K., Wawrzyńska, A., Lukomska, J., López-Moya, J.R., Liszewska, F., Assunção, A.G., Aarts, M.G., and Sirko, A.** (2009). Activity of the AtMRP3 promoter in transgenic *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum* plants is increased by cadmium, nickel, arsenic, cobalt and lead but not by zinc and iron. *J. Biotechnol.* 139, 258-263.

Identification de gènes impliqués dans la tolérance au Plomb chez la brassicacée, *Hirschfeldia incana*

Résumé

L'exploitation, puis l'abandon des sites miniers dans l'est marocain, a entraîné une importante pollution des zones avoisinantes, générée par la dispersion de déchets riches en Pb. Pour résoudre ce problème, des programmes de phytomanagement sont à développer. Cependant, la réalisation de ces projets se heurte à deux contraintes : une faible diversité des plantes métallobytes et une méconnaissance des mécanismes de la tolérance au Pb.

Dans ce contexte, l'objectif de mon travail de thèse a été de sélectionner une ou des plantes susceptibles d'entrer dans un programme de phytoremédiation et d'identifier des gènes impliqués dans la tolérance au Pb.

Dans un premier temps, l'analyse des sols et des résidus miniers a révélé une importante contamination polymétallique du site d'étude. Des prospections floristiques ont ensuite permis d'identifier une plante de la famille des brassicacées, *Hirschfeldia incana*, prédominante sur les sites miniers pollués et qui accumule le Pb. L'accumulation du Pb chez *H. incana* a été confirmée en conditions contrôlées et une stratégie « gène candidat » a montré l'implication dans la tolérance au Pb de deux gènes, l'un codant pour une métallothionéine MT2a et l'autre pour un transporteur membranaire HMA4. Enfin, la comparaison des transcriptomes d'*H. incana* et d'*A. thaliana* a abouti à l'édification d'une liste de gènes candidats susceptibles d'être impliqués dans la tolérance au Pb. L'analyse fonctionnelle de quatre de ces gènes, codant pour une ferritine, une métallothionéine, une protéine fixatrice du cuivre et une défensine, a précisé leur rôle dans la tolérance au Pb.

Mots clés : *Hirschfeldia incana*, plomb (Pb), tolérance, déchets miniers, pollution, phytoremédiation, *Arabidopsis thaliana*, transcriptome, Maroc.

Identification of genes involved in lead tolerance in *Hirschfeldia incana* (brassicaceae)

Abstract

Exploited, and then abandoned, mining sites, in the eastern Morocco, have polluted the neighboring regions, by dispersion of mining wastes containing Pb. Facing this problem, it is necessary to develop phytomanagement programs. Nevertheless, these project realisations encountered two major constraints: weak metallobyte plant diversity and misunderstanding of Pb tolerance mechanisms.

In this context, the objectif of my work was to select plants compatible with a phytoremediation program and to identify genes implicated in lead tolerance.

Firstly, soil and mining waste analysis has revealed an important polymetallic pollution of the studied region. Then, floristic explorations had permitted to identify a plant of the brassicaceae family, *Hirschfeldia incana*, which is predominant on the polluted mining regions and accumulated Pb. Pb accumulation in *H. incana* was confirmed in controlled conditions and a candidate gene approach has shown the lead tolerance implication of two genes, one coding for a metallothionein (MT2a) and the other a membrane transporter (HMA4). Finally, the transcriptome comparison from *H. incana* and *A. thaliana* has generated a list of candidate genes putatively implicated in Pb tolerance. Functional analysis of four genes, coding a ferretin, a metallothionein, a copper binding protein and a defensin, has permitted to clarify their role in Pb tolerance.

Key words: *Hirschfeldia incana*, lead (Pb), tolerance, mining wastes, pollution, phytoremediation, *Arabidopsis thaliana*, transcriptome, Morocco.

Thèse préparée au sein du Laboratoire de Biotechnologies des Plantes (LBP), Centre National de l'Energie, des Sciences et des Techniques Nucléaires (CNESTEN), Rabat, Maroc, dans le cadre du Laboratoire Mixte International « Biotechnologie microbienne et végétale » (IRD-UMR DIADE/CNESTEN/Université Mohammed V).